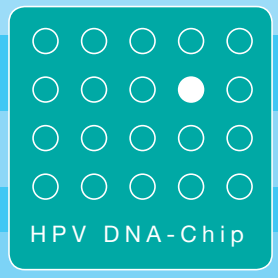


PapilloCheck®

Gebrauchsanweisung

Diagnostik Kit für die Genotypbestimmung von humanen Papillomaviren vom Typ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44/55, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 in Zervikalproben

REF 465 060

Nur zur Verwendung für die In-Vitro-Diagnostik durch geschultes Laborpersonal

Revision: BQ-013-08
Mai 2015

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Deutschland
Telefon: +49 (0) 7022 948-0 • Fax +49 (0) 7022 948-514
info@de.gbo.com • www.gbo.com/bioscience

greiner bio-one

CE IVD Made in Austria
8 °C
4 °C
Σ 60
DANGER

SYMBOLGLOSSAR

de	Im Dunkeln lagern	Mindestens haltbar bis	Vor Gebrauch Anweisung lesen	Katalognummer	Hersteller	In-Vitro-Diagnostika Medizinprodukt	Temperaturbegrenzung	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Reizend	Chargenbezeichnung	Wichtiger Hinweis
en	Store in the dark	Use by	Consult Instructions For Use	Catalog Number	Manufacturer	In Vitro Dianostic Medical Device	Temperature limitation	contains sufficient for <n> tests	Irritant	Batch code	Important Note
fr	À stocker à l'abri de la lumière	Date limite de conservation jusqu'au	Lire les instructions avant utilisation	Numéro de référence	Fabricant	Produit médical de diagnostic in-vitro	Limite de température	Contenu suffisant pour <n> tests	irritant	Code du lot	Note importante
es	Conservar en un lugar oscuro	A utilizar preferiblemente antes de	Antes de usar, lea las instrucciones	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstico in vitro	Limitación de temperatura	Contenido suficiente para <n> ensayos	Irritante	Código de lote	Nota importante
it	Conservare al buio	Da utilizzare entro e non oltre	Leggere le istruzioni prima dell'uso	Numero catalogo	Produttore	Dispositivo medico-diagnostico in-vitro	Limitazione temperatura	Contenuto sufficiente per test <n>	Irritante	Codice del lotto	Nota importante
pt	Conservar num local escuro	A utilizar preferívelmente antes de	Antes de usar, leia as instruções	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitação de temperatura	Conteúdo suficiente para <n> ensaios	irritante	Código do lote	Aviso importante
nl	Donker bewaren	Tenminste houdbaar tot	Gebruiksaanwijzing lezen	Catalogusnummer	Fabrikant	In vitro diagnostisch medisch product	Temperatuurbeperking	Voldoende inhoud voor <n> tests	Irriterend	Lot nummer	Belangrijke opmerking
da	Opbevares mørkt	Anvendes senest	Læs brugsanvisningen	Katalognummer	Producent	In vitro meskdicin doagnose-apparat	Temperaturbegrænsær	Indeholder nok til <n> test	Lokalirriterende	Lotnummer	Vigtig henvisning
sv	Förvaras mörkt.	Sista förbrukningsdag	Läs bruksanvisningen före användning	Katalognummer	Tillverkare	In vitro-medicinsk doagnostisk apparatur	Temperatur-begränsning	Innehållet räcker till <n> tester	irriterande	Lot nummer	Viktigt meddelande
pl	Przechowywa ć w ciemności	Termin zydatności	Przed użyciem przeczytać instrukcję	Numer katalogowy	Producent	Diagnostyka in vitro Produktyw	Ograniczenie temperatury	Zawartość wystarcza na <n> testów	drażniący	Kod partii	Ważne
no	Oppbevares mørkt	holdbar til	Les bruksanvisning før bruk	katalognummer	produsent	in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr	temperaturbegrensning	Innhold tilstrekkelig for <n> tester	irriterende	batch nr.	Viktig merknad
el	Αποθηκεύεται στα σκοτεινά	το λιγότερο διατηρείται	πριν την χρήση διαβάστε τις οδηγίες	Αριθμός Καταλόγου	Παραγωγός	In vitro διαγνωστικά ιατρικά προϊόντα	περιορισμός θερμοκραοίας	Περιεχόμενο αροκετό για <n> τεοτ	ερεθιστικό	κωδικός παρτίδας	Σημαντική υπόδειξη
tr	Karanlık yerde saklayınız	Son kullanma tarihi:	Kullanmadan önce talimatı okuyun	Katalog numarası	Üretici firma	In vitro diagnostik tıbbi tanı ürünü	Sıcaklık sınırlaması	İçeriği <n> test için yeterlidir	Tahriş edici	Parti kodu	Önemli Not

INHALTSVERZEICHNIS

1. INHALT DES KITS 5

2. VERBRAUCHSMATERIALIEN UND EQUIPMENT 6

3. VERSAND UND LAGERUNG 8

4. SICHERHEITSHINWEISE 8

5. ENTSORGUNG 9

6. EINLEITUNG 10

6.1 Zweckbestimmung 10
6.2 Mit PapillOCheck® nachweisbare HVP-Typen 10
6.3 Testprinzip 11
6.4 Design des PapillOCheck® DNA-Chips 13
6.4.1 PapillOCheck® Chip-Layout 13
6.4.2 On-Chip-Kontrollen 14

7. ANLEITUNGEN FÜR DEN PAPILLOCHECK® ARBEITSABLAUF 15

7.1 Allgemeine Hinweise 15
7.2 Raumaufteilung 15
7.3 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen 16
7.3.1 Vermeidung von Kontaminationen 16
7.3.2 Anleitung zur Handhabung der DNA-Chips 16
7.3.3 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen 16
7.3.4 Sichere Arbeitsweise 17

8. PAPILLOCHECK® VERFAHREN 18

8.1 Probenentnahme und DNA-Extraktion 18
8.1.1 Probenentnahme 18
8.1.2 DNA-Extraktion 20
8.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) 21
8.2.1 Einstellen des Thermocyclers 21
8.2.2 Behandlung mit Uracil-N-Glycosylase (UNG) 22
8.2.3 Ansatz der PCR-Reaktion 23
8.3 Hybridisierung und Waschen 25
8.3.1 Vorbereitung 25
8.3.2 Hybridisierung 27
8.3.3 Waschen und Trocknen 29
8.4 Scannen und Auswertung des PapillOCheck® Chips 31

9. FEHLERBEHEBUNG 32

10. TECHNISCHER SUPPORT 33

11. LEISTUNGSMERKMALE VON PAPILLOCHECK® 34

11.1 Analytische Leistungsbewertung von PapilloCheck® 34
11.1.1 Analytische Sensitivität 34
11.1.2 Analytische Spezifität – HPV-Typen 35
11.1.3 Analytische Spezifität – Nicht-HPV-Organismen 35
11.2 Wiederholpräzision 36
11.3 Vergleichspräzision 37
11.4 Robustheit 38
11.5 Klinische Leistungsbewertung von PapilloCheck® 39

12. PAPILLOCHECK® KURZPROTOKOLL 41

12.1 Raum 2: PCR - Ansatz des Reaktionsgemisches 41
12.2 Raum 2: PCR - Zugabe von DNA-Template / PCR-Reaktion 42
12.3 Raum 3: Hybridisierung - Vorbereitung / Hybridisierungsreaktion 43
12.4 Raum 3: Waschen & Trocknen/ Scannen & Auswertung 44

1. INHALT DES KITS

Papill**oCheck**® **Testkit**[1]	**Inhalt**	**Menge**
PCR MasterMix	5 x Papill**oCheck**® PCR MasterMix[2]	5 x 300 µl
Slidebox, 5 x 12 Arrays	1 x Papill**oCheck**® Slidebox mit 5 Papill**oCheck**® Chips[3]	5 x 12 Arrays
Hybridisierungspuffer	2 x Papill**oCheck**® Hybridisation Buffer	2 x 1.000 µl
Puffer A Konzentrat	2 x Papill**oCheck**® BUF A conc.	2 x 40 ml
Puffer B Konzentrat	1 x Papill**oCheck**® BUF B conc.	1 x 15 ml

[1] Ein Papill**oCheck**® Testkit ist ausreichend für die Analyse von 60 Proben.
[2] Enthält alle für die PCR benötigten Komponenten, außer der Taq-DNA-Polymerase und der Uracil-N-Glycosylase.
[3] Ein Papill**oCheck**® Chip enthält 12 Papill**oCheck**® Microarrays.

2. VERBRAUCHSMATERIALIEN UND EQUIPMENT

Papill**oCheck**® sollte nur zusammen mit dem aufgeführten Verbrauchsmaterial und Equipment und nur von Fachpersonal angewendet werden.

Verbrauchsmaterialien	Greiner Bio-One Kat.- Nr.	Menge
Papill**oCheck**® Testkit	465 060	Testkit für 60 Reaktionen
Papill**oCheck**® Probenentnahmeset	465 075	50 Proben
oCheck® DNA-Extraktionskit / Einzelsäulenaufreinigung	515 040	Testkit für 50 Aufreinigungen
Sterile, DNase-freie Mikropipettor-Filterspitzen[1]		
0,5-10 µl Filterspitzen	765 288	96/960
0,5-20 µl Filterspitzen	774 288	96/960
10-100 µl Filterspitzen	772 288	96/960
10-200 µl Filterspitzen	739 288	96/960
100-1000 µl Filterspitzen	750 288	60/600
DNase-freie Reaktionsgefäße		
1,5 ml Reaktionsgefäße	616 201	500/4000
0,2 ml Reaktionsgefäße[2]	683 201	500/1000
8 x 0,2 ml PCR-Streifen	673 210	125/1250
Deckelketten für 8 x 0,2 ml PCR-Streifen	373 270	125/1250
50 ml Polypropylengefäße[3]	210 261	25/450
Kunststoffpipetten für Pipettor		
10 ml Pipette	607 180 oder 607 160	1/200
25 ml Pipette	760 180 oder 760 160	1/200
50 ml Pipette	786 180 oder 768 160	1/200

[1] Einige der genannten Spitzengrößen sind optional, je nachdem, welche Mikropipetten zur Verfügung stehen.
[2] Prinzipiell wird die Verwendung von PCR 8er-Streifen empfohlen. Wenn keine PCR-Streifen zur Verfügung stehen, können auch Einzelreaktionsgefäße (0,2 ml) verwendet werden.
[3] Nur erforderlich, wenn keine Objektträgerzentrifuge zur Verfügung steht.

Equipment	Greiner Bio-One Kat.- Nr.	Menge
CheckScanner™	862 070	1
CheckReport™ Software Basisversion	862 080	1
CheckReport™ Software Papill**oCheck**® Plugin	862 081	1
oCheck® Hybridisierungskammer mit Objektträgerhalter	447 070	1
Computer für CheckScanner™ und CheckReport™Software	862 900	1
Griff für Objektträgerhalter	447 001	1
oCheck® Waschbehälter[4]	447 020	1

Benötigte Enzyme

- Taq Polymerase: HotStarTaq® DNA-Polymerase 5 U/µl (Qiagen; 203203, 203205, 203207, 203209)
- Uracil-N-Glycosylase: Uracil-DNA Glycosylase 1 U/µl (Fermentas; EN0361, EN0362)

Zusätzliche Verbrauchsmaterialien

- PCR-Wasser
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- Einmalhandschuhe

Zusätzliches Equipment

- Tischzentrifuge für 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße
- Zentrifuge für 50 ml Polypropylengefäße (z. B. BeckmanCoulter; Zentrifuge Allegra X-22; Festwinkelrotor C0650) oder Objektträgerzentrifuge (z. B. Labnet: Slide Spinner; VWR International: Galaxy MiniArray-Zentrifuge)
- Tischzentrifuge für einzelne 0,2 ml Reaktionsgefäße oder PCR 8er-Streifen (z. B. Labnet: Spectrafuge-Minizentrifuge)
- PCR-Thermocycler:
  GeneAmp® PCR-System 9700 (Applied Biosystems)
  Veriti™ 96-Well-Thermocycler (Applied Biosystems)
  peqSTAR 96X Universal (PEQLAB Biotechnology GmbH)
- Wasserbad (50 °C)
- Mikropipetten (verschiedene Volumenbereiche von 1 - 1000 µl)
- 8-Kanal-Multipipette (Volumenbereich: 5 - 50 µl), z. B. Brand Transferpette®-8 (Brand)
- Pipettor für Glas- und Kunststoffpipetten
- Vortex-Mixer
- Ständer für verschiedene Reaktionsgefäße

Zusätzliches Equipment

- Computer (hinsichtlich der Systemanforderungen sind die Gebrauchsanweisungen des CheckSanner™ und der CheckReport™ Software zu beachten)

[4] Für die Papill**oCheck**®-Waschschritte werden drei oCheck® Waschbehälter benötigt.

3. VERSAND UND LAGERUNG

Das Papill**oCheck**® Testkit wird bei Raumtemperatur versendet. Dennoch muss das Kit nach Erhalt umgehend **bei 4-8 °C** und lichtgeschützt aufbewahrt werden. Bei sachgemäßer Aufbewahrung können das Papill**oCheck**® Testkit und seine Komponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. Unter diesen Aufbewahrungsbedingungen entspricht das Haltbarkeitsdatum auch nach dem ersten Öffnen des Kits und seiner Komponenten dem Verfallsdatum.

4. SICHERHEITSHINWEISE

Das Papill**oCheck**® Testkit ist nur für die Verwendung im Labor und nicht als Arzneimittel, für den Gebrauch zu Hause oder für andere Zwecke bestimmt. Tragen Sie stets einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und Schutzbrille und beachten Sie die in diesem Abschnitt aufgeführten Sicherheitshinweise.

Die folgenden Komponenten des Papill**oCheck**® Testkits enthalten gesundheitsschädliche oder gefährliche Substanzen.

Kitkomponentenmenge	Gefährliche Substanzen (Menge)	Klassifizierung gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	GHS-Piktogramm und Signalwort	H- und P-Sätze	
Papill**oCheck**® Hybridisierungspuffer	Guanidinthiocyanatlösung, 25-60 %, CAS-Nr. 593-84-0	Akute orale Toxizität (Kategorie 4) Akute inhalative Toxizität (Kategorie 4) Chronische aquatische Toxizität (Kategorie 3) Hautätzend (Kategorie 1c)	 GEFAHR	H302 H332 H314 H412 P273 P280 P305+P351+ P338 EUH032	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Gesundheitsschädlich beim Einatmen. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Unverzüglich ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen. Ergänzende Angaben zu Gefahrstoffen (EU): Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
Papill**oCheck**® Puffer B	Natriumdodecylsulfatlösung <20 %, CAS-Nr. 151-21-3	Hautreizend (Kategorie 2) Schwere Augenschäden (Kategorie 1)	 GEFAHR	H315 H318 P280 P305+P351+ P338	Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenschäden. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Die aktuelle Version des Sicherheitsdatenblatts für dieses Produkt kann von der Greiner Bio-One Website heruntergeladen werden: **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

5. ENTSORGUNG

Nach dem Waschen und Trocknen des Papill**oCheck**® Chips können die Waschlösungen I, II und III ohne weitere besondere Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Den gebrauchten Papill**oCheck**® Chip, unbenutzte Kitkomponenten und unbenutzten Hybridisierungsmix im Labormüll entsorgen. Befolgen Sie die national und regional geltenden Richtlinien zur Abfallentsorgung.

6. EINLEITUNG

In praktisch allen Fällen von Gebärmutterhalskrebs, der zweithäufigsten Krebserkrankung bei Frauen weltweit, liegt eine persistierende Infektion mit einem karzinogenen humanen Papillomavirus (HPV) vor.[1] Bislang sind über 100 HPV-Typen identifiziert worden, von denen etwa 40 sexuell übertragen werden und die Genitalschleimhaut infizieren. Zervikale HPV-Typen werden in eine Hochrisikogruppe (high-risk HPV, hrHPV) und eine Niedrigrisikogruppe (low-risk HPV, lrHPV) eingeteilt. Die Hochrisiko-HPV-Typen werden generell mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Zervikalkarzinoms in Verbindung gebracht, wohingegen die HPV-Typen in der Niederrisikogruppe überwiegend gutartige Genitalwarzen hervorrufen.[2] Doch auch innerhalb der Hochrisikogruppe ist das relative Risiko der Entwicklung von Krebs bzw. zervikalen intraepithelialen Läsionen (CIN) vom Virustyp abhängig.[3] Etwa 70 % aller Zervikalkarzinome werden mit einer persistierenden Infektion mit HPV 16 oder 18 in Zusammenhang gebracht. Unter den Niedrigrisiko-Typen haben HPV 6 und 11 die höchste Prävalenz. Aufgrund einer fast 100%igen ätiologischen Verknüpfung zwischen karzinogenem HPV und Zervikalkarzinom werden Tests auf hrHPV inzwischen im Rahmen der primären Gebärmutterhalskrebsvorsorge in Betracht gezogen.[4]

6.1 Zweckbestimmung

Bei Papill**oCheck**® handelt es sich um ein diagnostisches Kit für den qualitativen Nachweis und die Genotypisierung von 24 Typen des humanen Papillomavirus in DNA-Aufreinigungen aus menschlichen Zervikalabstrichen. Das Kit ist nur zur Verwendung durch qualifiziertes Personal bestimmt.

Papill**oCheck**® entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In-Vitro-Diagnostika (98/79/EG) und ist folglich mit der CE-Kennzeichnung versehen. Alle mit Papill**oCheck**® erhaltenen Diagnostikergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen oder Laborbefunden ausgewertet werden.

6.2 Mit Papill**oCheck**® nachweisbare HPV-Typen

Papill**oCheck**® ermöglicht die Identifizierung von 18 Hochrisiko- ☐ und 6 Niedrigrisikotypen ☐ des humanen Papillomavirus (HPV) (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Mit Papill**oCheck**® **nachweisbare HPV-Typen**

HPV 16	**HPV 45**	**HPV 59**	**HPV 6**
HPV 18	**HPV 51**	**HPV 66**	**HPV 11**
HPV 31	**HPV 52**	**HPV 68**	**HPV 40**
HPV 33	**HPV 53**	**HPV 70**	**HPV 42**
HPV 35	**HPV 56**	**HPV 73**	**HPV 43**
HPV 39	**HPV 58**	**HPV 82**	**HPV 44 / HPV 55***

* Papill**oCheck**® ist nicht zur Differenzierung zwischen HPV 44 und HPV 55 geeignet.

[1] Walboomers, J. et al (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 189(1):12-9.
[2] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003;16:1–17.
[3] Bosch F.X. et al. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine. 26 Suppl 10:K1-16.
[4] Meijer, C.J. et al. (2009). Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. Int J Cancer. 124(3):516-20.

6.3 Testprinzip

Papill**oCheck**® ist ein Microarray-basiertes Testkit für den Nachweis und die Genotypisierung eines Fragments des E1-Gens im Genom des humanen Papillomavirus (HPV). Das Testprotokoll ist in **Abbildung 1** im Überblick dargestellt.

Vor der Papill**oCheck**® Analyse muss zunächst DNA aus einer zervikalen Abstrichprobe extrahiert werden. Probenentnahme und DNA-Extraktion sind nicht Teil des Papill**oCheck**® Testkits. Speziell vorgesehene Produkte für die Probenentnahme (Papill**oCheck**® Probenentnahmeset) und die DNA-Extraktion (oCheck® DNA-Extraktionskit) sind separat von Greiner Bio-One erhältlich (Bestellinformationen finden Sie in Kapitel 2).

Nach der Extraktion von viraler und menschlicher genomischer DNA aus einer zervikalen Probe wird ein 350 bp-Fragment des viralen E1-Gens mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) in Gegenwart eines Sets HPV-spezifischer Primer amplifiziert. In derselben Reaktion wird ein Fragment des menschlichen Single-Copy-Gens ADAT1 (humane tRNA-spezifische Adenosindeaminase1) amplifiziert, um das Vorhandensein von menschlichem Probenmaterial in der zervikalen Probe zu überwachen (Probenkontrolle). Außerdem wird zur Kontrolle der PCR ein im Papill**oCheck**® PCR MasterMix vorhandenes internes Kontroll-Template amplifiziert (PCR-Kontrolle). Der Papill**oCheck**® PCR MasterMix enthält zudem dUTP. Mit einer Uracil-N-Glycosylase (UNG)-Behandlung lässt sich so eine mögliche Kontamination mit PCR-Produkten aus vorherigen PCR-Reaktionen verhindern (siehe Kapitel 8.2.2).

Anschließend werden die PCR-Produkte an spezifische DNA-Sonden und On-Chip-Kontrollen auf der Papill**oCheck**® Chip-Oberfläche hybridisiert. Jeder Chip enthält 12 DNA-Microarrays, sodass 12 zervikale Proben gleichzeitig analysiert werden können. Während der Hybridisierung wird die gebundene DNA fluoreszenzmarkiert und ungebundene DNA wird in anschließenden Waschschritten entfernt. Die Effizienz der Hybridisierung wird überwacht (Hybridisierungskontrolle).

Abschließend wird der Papill**oCheck**® Chip automatisch mithilfe des CheckScanner™ gescannt und mit der CheckReport™ Software analysiert und ausgewertet (Bestellinformationen finden Sie in Kapitel 2). Der CheckScanner™ ist ein Zweifarben-Laserscanner (Anregungswellenlängen: 532 und 635 nm), mit dem die von den vorhandenen HPV-spezifischen Amplifikationsprodukten und den Kontrollen erzeugten Fluoreszenzsignale erfasst werden können (siehe Kapitel 6.4.2). Die CheckReport™ Software ermöglicht die Visualisierung, Analyse und Auswertung der Ergebnisse und fasst die Werte der erfassten HPV-Typen und der Kontrollen automatisch in einem Bericht zusammen.

Der Bericht enthält übersichtliche Angaben darüber, ob einer oder mehrere der 24 nachweisbaren HPV-Typen vorhanden sind und um welche(n) Typ(en) es sich dabei handelt. Dank der umfassenden On-Chip-Kontrollen ist die Analyse darüber hinaus in höchstem Maße zuverlässig.

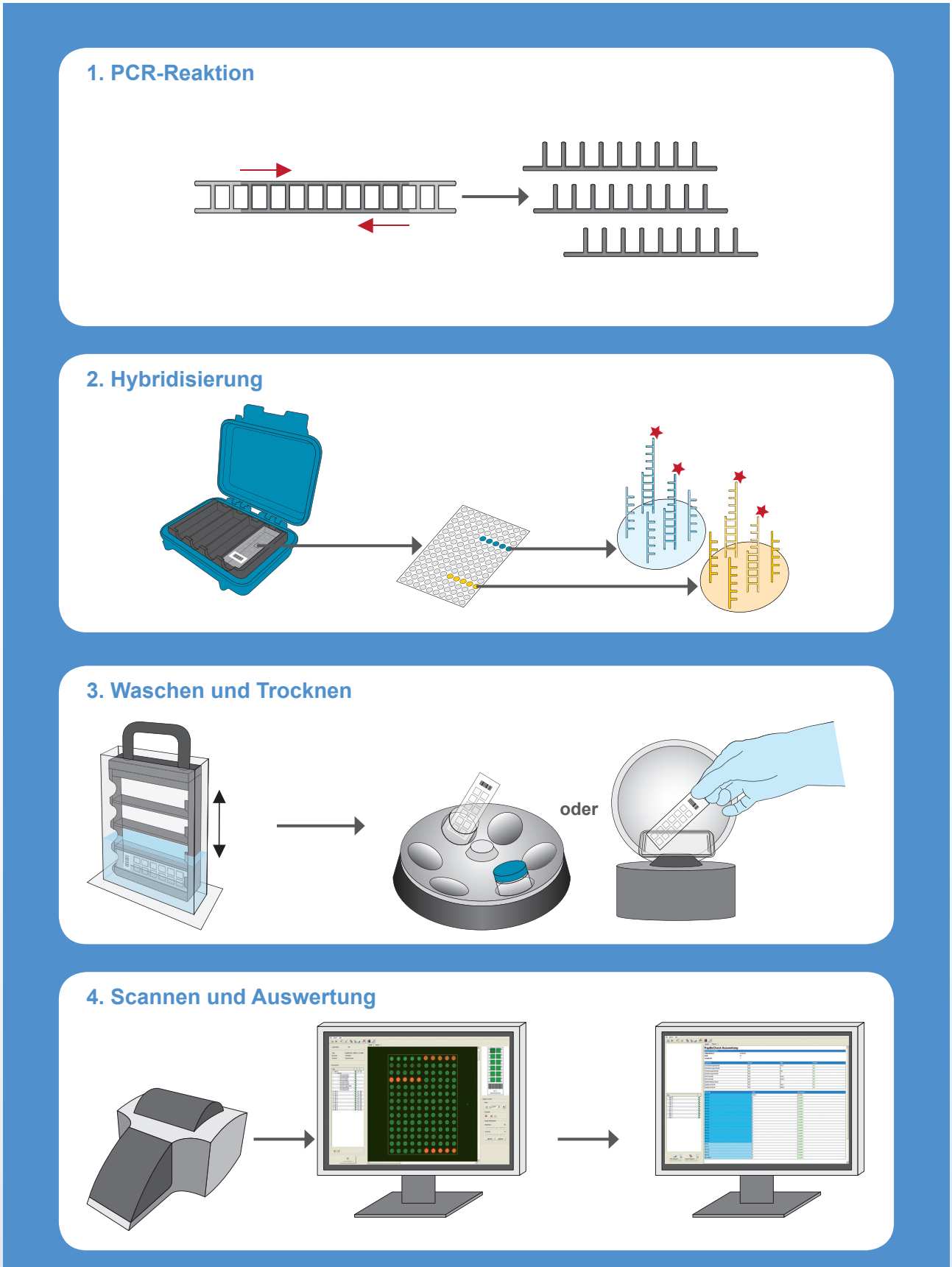


Abbildung 1: Papill**oCheck**® **Testprotokoll**

1. **PCR-Reaktion:** Nach der DNA-Extraktion werden ein 350 bp-Fragment des viralen E1-Gens und Fragmente der beiden Kontroll-Targets mittels PCR amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte werden anschließend an komplementäre DNA-Sonden auf dem Chip hybridisiert.
2. **Hybridisierung:** Jeder HPV-Typ wird von einer spezifischen, in fünf Replikaten vorhandenen DNA-Sonde erfasst. Während der Hybridisierung wird die gebundene DNA fluoreszenzmarkiert.
3. **Waschen und Trocknen:** Ungebundene DNA wird anschließend durch mehrmaliges Waschen entfernt.
4. **Scannen und Auswertung:** Der Papill**oCheck**® Chip wird mit dem CheckScanner™ und der CheckReport™ Software gescannt, analysiert und ausgewertet. Es wird ein Bericht mit übersichtlichen Angaben darüber erstellt, ob einer oder mehrere der 24 nachweisbaren HPV-Typen vorhanden sind und um welche(n) Typ(en) es sich dabei handelt.

6.4 Design des PapillоCheck® DNA-Chips

6.4.1 PapillоCheck® Chip-Layout

Jeder PapillоCheck® Chip enthält 12 Microarrays mit der Bezeichnung Well A1 - B6. Jeder PapillоCheck® Mikroarray enthält 28 verschiedene Sonden und ist von einem erhöhten Rand umgeben. Jede Sonde wird in fünf Replikaten aufgetragen (Spots). Das Layout des PapillоCheck® Mikroarray ist in **Abbildung 2** gezeigt, und die On-Chip-Kontrollen sind in Kapitel 6.4.2 näher erläutert.

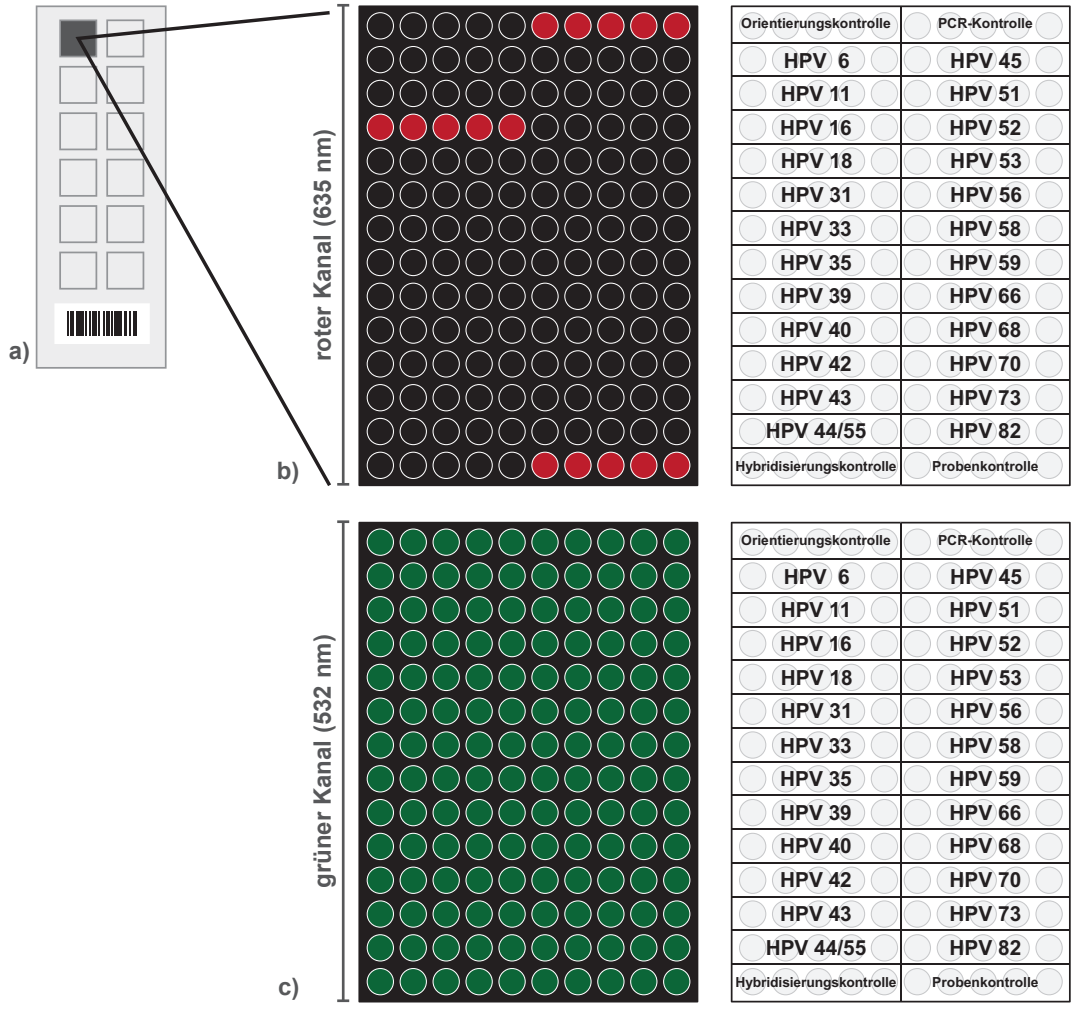


Abbildung 2: Aufbau des PapillоCheck® Chips
a) Schema des PapillоCheck® Chips. **b)** und **c)** Von der CheckReport™ Software angezeigte Bilder bei den beiden beim Scannen verwendeten, unterschiedlichen Anregungswellenlängen (b) roter Kanal: 635 nm; c) grüner Kanal: 532 nm) und Layout-Schema des PapillоCheck® Mikroarrays. Es sind HPV-Typen-spezifische Sonden und On-Chip-Kontrollen dargestellt.

6.4.2 On-Chip-Kontrollen

Das Design des Papill**oCheck**® DNA-Chips umfasst zahlreiche On-Chip-Kontrollen. Mehrere Kontrollsysteme überwachen alle kritischen Schritte des Tests und der Chip-Verarbeitung, einschließlich der Probenqualität und der DNA-Extraktion (Probenkontrolle), der Qualität der PCR-Reaktion (PCR-Kontrolle), der Effizienz der Hybridisierung (Hybridisierungskontrolle) sowie der Spot-Homogenität der aufgetragenen Sonden und der Druckqualität (Orientierungskontrolle und Druckkontrolle). Die CheckReport™ Software zeigt nicht nur das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von HPV-Typen an, sondern fasst auch automatisch die entsprechenden Werte der Kontrollen in einem ausführlichen Bericht zusammen. Zum Auslesen der verschiedenen Kontrollen werden beide Anregungswellenlängen des CheckScanner™ verwendet. Der rote Kanal (Anregungswellenlänge: 635 nm) dient der Kontrolle der Qualität der Analyse (Proben- und PCR-Kontrolle), der grüne Kanal (Anregungswellenlänge: 532 nm) der Kontrolle der Qualität der Hybridisierung und des Chips (Hybridisierungs-, Orientierungs- und Druckkontrolle).

Probenkontrolle
Papill**oCheck**® überwacht die Qualität der Proben und/oder der DNA-Extraktion durch Amplifikation des menschlichen Single-Copy-Gens ADAT1 (humane tRNA-spezifische Adenosindeaminase1). Wenn in der extrahierten DNA aus der zervikalen Probe eine ausreichende Menge an menschlicher DNA vorhanden ist, wird auf den Spots der Probenkontrolle ein Fluoreszenzsignal erzeugt.

Wenn keine oder eine unzureichende ADAT1-Amplifikation stattfindet, gibt die CheckReport™ Software die Probenkontrolle als „failed“ (fehlgeschlagen) an und die Analyse muss wiederholt werden, weil entweder zu wenig Zellen in der Zervikalprobe vorhanden sind und/oder die Extraktionsqualität ungenügend ist (siehe Kapitel 9).

PCR-Kontrolle
Papill**oCheck**® überwacht auch die Qualität der PCR-Reaktion. Bei Amplifikation eines im Papill**oCheck**® PCR-MasterMix vorhandenen internen Kontroll-Template wird auf den Spots der PCR-Kontrolle auf dem Papill**oCheck**® Chip ein Signal erzeugt. Die Qualität der Amplifikationsreaktion wird von der CheckReport™ Software automatisch überwacht. Wenn die PCR-Qualität einen vordefinierten Schwellenwert unterschreitet, gibt die CheckReport™ Software die PCR-Kontrolle als „failed“ (fehlgeschlagen) an und die Analyse muss wiederholt werden (siehe Kapitel 9).

Auch wenn in der Probe sehr viel HPV-DNA vorhanden ist, kann das Fluoreszenzsignal der PCR-Kontrolle sehr schwach sein oder sogar ganz fehlen, weil es während der PCR-Reaktion zu einer Kompetition kommt. In diesem Fall muss das Fluoreszenzsignal mindestens einer HPV-spezifischen Sonde einen vordefinierten Schwellenwert überschreiten, damit der Test gültig ist.

Hybridisierungskontrolle
Papill**oCheck**® überwacht die Effizienz der Hybridisierung mithilfe einer fluoreszenzmarkierten Sonde im Papill**oCheck**® Hybridisierungspuffer, die an spezifische DNA-Sequenzen auf dem Papill**oCheck**® Chip hybridisiert. Bei einer ausreichenden Hybridisierungseffizienz wird auf jedem Spot ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Die Ergebnisse der fünf Hybridisierungskontrollspots auf dem Papill**oCheck**® Chip werden ebenfalls von der CheckReport™ Software ausgewertet.

Orientierungs- und Druckkontrolle
Die Spots mit der Orientierungskontrolle auf dem Papill**oCheck**® Chip erzeugen Fluoreszenzsignale unabhängig von der Effizienz des Hybridisierungsvorgangs. Diese Spots dienen der CheckReport™ Software als Richtpunkte für das präzise Auffinden der Spots, einer Voraussetzung für die korrekte Analyse der Signale. Darüber hinaus wird die Qualität des Druckvorgangs durch Vorhandensein eines Fluoreszenzsignals an jedem Spot (Druckkontrolle) überwacht.

7. ANLEITUNGEN FÜR DEN PAPILLOCHECK® ARBEITSABLAUF

7.1 Allgemeine Hinweise

Bei der Etablierung von modernsten molekularbiologischen Methoden müssen folgende Hinweise genau befolgt werden, um eine maximale Sicherheit für das Laborpersonal zu gewährleisten und qualitativ hochwertige Ergebnisse zu erreichen.

Molekularbiologische Prozesse, wie DNA-Extraktion, Amplifikation und Nachweis von DNA müssen von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden. Darüber hinaus ist ein sauberer und gut strukturierter Arbeitsablauf von entscheidender Bedeutung als Vorbeugemaßnahme gegen falsche Ergebnisse, die durch Abbau der Proben-DNA oder Kontamination mit Amplifikaten entstehen könnten. Dazu ist es erforderlich, die Laborbereiche für Extraktion, Amplifikation und Detektion wie in Kapitel 7.2 beschrieben voneinander zu trennen.

In jedem Bereich sollten separate Ausrüstung, Verbrauchsmaterialien, Laborkittel und Handschuhe vorhanden sein. Überführen Sie niemals Laborkittel, Handschuhe oder Equipment von einem Bereich in einen anderen.

7.2 Raumaufteilung

Abbildung 3 zeigt beispielhaft eine Aufteilung eines Labors in drei separate Bereiche. Ein Bereich wird nur zur DNA-Extraktion verwendet, ein anderer ist zum Ansetzen und zur Durchführung von PCR-Reaktionen bestimmt und im letzten Bereich erfolgen Hybridisierung und Analyse. Jeder Raum ist ausschließlich für die zweckbestimmte Anwendung oder Technik zu verwenden, um eine Kontamination der Proben zu verhindern. Um die versehentliche Verwendung von Ausrüstungen und Verbrauchsmaterialien in mehreren Bereichen zu vermeiden, wird eine Kennzeichnung mit unterschiedlicher Farbcodierung empfohlen.

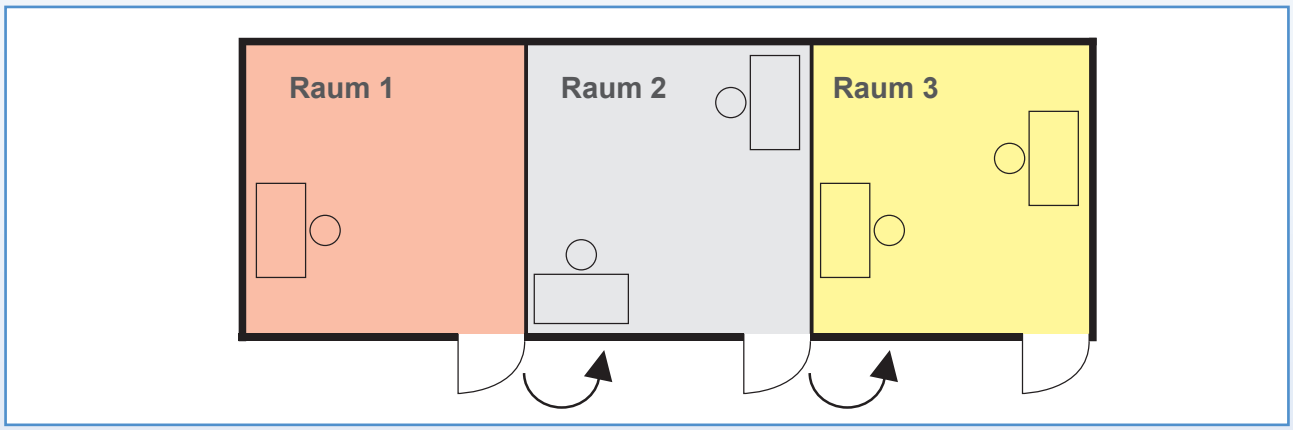


Abbildung 3: Raumaufteilung
Raum 1: In diesem Raum wird die komplette DNA-Extraktion durchgeführt.
Raum 2: In Raum 2 wird der Reaktionsmix für die PCR hergestellt und aufgeteilt (optimal ist die Verwendung einer PCR-Hood). Die Zugabe der in Raum 1 extrahierten DNA-Proben muss in einem separaten Bereich in Raum 2 erfolgen.
Raum 3: Im dritten Laborraum werden die Hybridisierungsreaktion, die Waschschritte und die Trocknung des Chips durchgeführt. Zudem befindet sich hier der CheckScanner™ in Verbindung mit der CheckReport™ Software für die abschließende Analyse des Papill**oCheck**® Tests.

! Weder Equipment/Ausrüstung noch Verbrauchsmaterialien sollten zwischen den verschiedenen Laborräumen und -bereichen ausgetauscht werden. Daher ist die Bereitstellung von Ausrüstungsgegenständen und Verbrauchsmaterialien in jedem Laborraum unabdingbar und sollte bei der Ausstattung des Labors einkalkuliert werden.

7.3 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

7.3.1 Vermeidung von Kontaminationen

- Laborkittel müssen bei allen Arbeitsschritten getragen werden; dabei sind für jeden Laborraum eigene Laborkittel erforderlich.
- Handschuhe müssen bei jedem Analyseschritt getragen und häufig gewechselt werden, vor allem während der DNA-Extraktion.
- Der Arbeitsplatz muss mit einer geeigneten Reinigungslösung dekontaminiert werden.
- Berühren Sie niemals die Innenseite des Deckels des Reaktionsgefäßes. Öffnen Sie zur Vermeidung einer Kreuzkontamination jeweils nur ein Gefäß.
- Es müssen geeignete Filterspitzen mit Aerosolbarriere verwendet werden (frei von DNase, RNase und humaner DNA). Die Pipettenspitzen sollten zwischen Flüssigkeitstransfers stets gewechselt werden.

7.3.2 Anleitung zur Handhabung der DNA-Chips

- DNA-Chips sollten in einer staubfreien Umgebung verwendet werden. Die Ablagerung von Staub und anderen Partikeln auf der Chip-Oberfläche ist zu vermeiden.
- Die Hybridisierungszone auf der Chip-Oberfläche darf nicht berührt werden.
- Für die Hybridisierung ist nur die mit einem Barcode gekennzeichnete Seite des Chips bestimmt.
- Beschriften Sie die DNA-Chips nicht. Markerstifte können unspezifische Fluoreszenz auf dem Chip erzeugen.
- Die DNA-Arrays sind nur für den Einmalgebrauch bestimmt. Hybridisierte Chips können nicht wiederverwendet werden.
- Bewahren Sie unbenutzte Chips in der Originalkunststoffbox (Slidebox) auf. Diese sollte im verschlossenen Folienbeutel mit Trockenmittel aufbewahrt werden.

7.3.3 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

- Dieses Kit ist nur zur In-Vitro-Diagnostik vorgesehen und sollte ausschließlich von Personal verwendet werden, das in den Laborpraktiken für die In-Vitro-Diagnostik geschult wurde.
- Überprüfen Sie die Kitkomponenten bei Lieferung auf etwaige Beschädigungen. Sollte eine der Komponenten (z. B. Pufferflaschen) beschädigt sein, setzen Sie sich mit dem Greiner Bio-One Vertriebshändler vor Ort in Verbindung. Verwenden Sie keine beschädigten Kitkomponenten, da dies zu Leistungseinbußen des Kits führen kann.
- Verwenden Sie das Papill**oCheck**® Testkit nicht nach dem Verfallsdatum.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien.
- Mischen Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen.
- Verwenden Sie nur Reagenzien/Ausrüstung, die mit dem Kit geliefert wurden bzw. vom Hersteller empfohlen werden.
- Die Mikropipetten, das Wasserbad und der Heizblock müssen regelmäßig geeicht bzw. gewartet werden.
- Das Pipettieren von kleinen Flüssigkeitsmengen im Mikroliterbereich erfordert Übung. Achten Sie daher darauf, dass Sie die benötigten Volumina mit den Mikropipettoren so präzise wie möglich pipettieren.
- Verhindern Sie die Kontamination von Reagenzien bei der Entnahme von Aliquots aus Reagenzgefäßen.
- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur (18-25 °C) durchgeführt werden.

7.3.4 Sichere Arbeitsweise

- Gehen Sie bei der Handhabung biologischer Proben, die humanes potenziell infektiöses Material enthalten, mit äußerster Vorsicht vor. Zur Verringerung der Infektionsgefahr wird empfohlen, in einer Sterilbank zu arbeiten, bis die Proben vollständig lysiert wurden. Handhaben und entsorgen Sie alle biologischen Proben so, als ob diese infektiöse Erreger übertragen könnten.
- Pipettieren Sie niemals mit dem Mund.
- Essen, Trinken, Rauchen und das Auftragen von Kosmetika sind in den Arbeitsbereichen untersagt.
- Vermeiden Sie den direkten Kontakt mit den biologischen Proben sowie ein Verspritzen oder Versprühen der Proben.
- Tragen Sie bei der Arbeit mit humanen Proben stets einen Laborkittel, Handschuhe und eine Schutzbrille.
- Waschen Sie Ihre Hände nach der Handhabung von Proben und Reagenzien gründlich.

8. PAPILL**OCHECK® VERFAHREN**

Das folgende Kapitel enthält eine ausführliche Beschreibung der verschiedenen Arbeitsschritte, die zur Erstellung eines detaillierten Berichts führen. In diesem Bericht ist übersichtlich und für jede analysierte Zervikalprobe angegeben, ob darin einer oder mehrere der 24 nachweisbaren HPV-Typen vorhanden ist/sind und um welche(n) Typ(en) es sich dabei handelt. **Abbildung 4** zeigt eine Übersicht über die verschiedenen durchzuführenden Arbeitsschritte. Außerdem ist angegeben, in welchem Unterkapitel der jeweilige Schritt des Testprotokolls beschrieben wird. Die Arbeitsschritte müssen in der in diesem Kapitel aufgeführten Reihenfolge durchgeführt werden. Jeder spezifische Arbeitsschritt ist mit einem blauen Pfeil ➠ gekennzeichnet.

!

Die Probenentnahme, die DNA-Extraktion und die Analyse mit der CheckReport™ Software sind nicht Teil des Papill**oCheck®** Testkits. Daher ist die Beschreibung dieser Arbeitsschritte in diesem Kapitel abgekürzt. Ausführliche Informationen finden Sie in der jeweiligen Gebrauchsanweisung, z. B. des Papill**oCheck®** Probenentnahmesets, des oCheck® DNA-Extraktionskits und der CheckReport™ Software.

8.1 Probenentnahme und DNA-Extraktion

8.1.1 Probenentnahme

Die Probenentnahme ist nicht Teil des Papill**oCheck®** Testkits. Ein Probenentnahmeset für zervikale Proben ist ebenfalls von Greiner Bio-One erhältlich (Papill**oCheck®** Probenentnahmeset) (Bestellinformationen finden Sie in Kapitel 2).

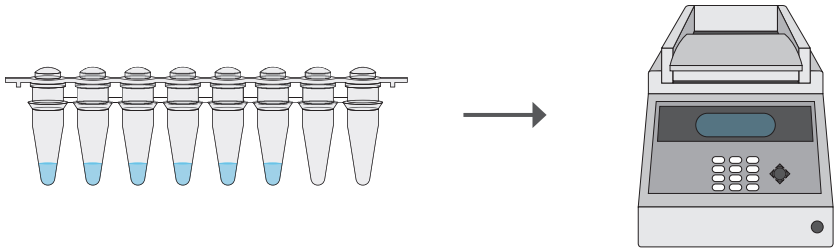
Papill**oCheck®** wurde validiert mit DNA, die mit dem oCheck® DNA-Extraktionskit aus menschlichen zervikalen Abstrichen gewonnen wurde, welche mit einem der folgenden Probenentnahme-Systeme bzw. -Medien vorgenommen wurde:

- Papill**oCheck®** Probenentnahmeset (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
- PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, USA)
- Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)
- STM™ (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Easyfix (Labonord, Templemars, Frankreich)
- Cyt-All (Alphapath, Mauguio, Frankreich).

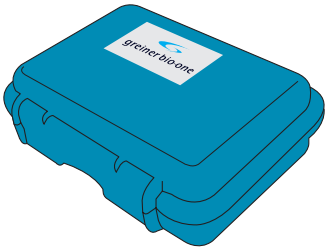
Weitere Informationen über geeignete Transportmedien oder DNA-Extraktionssysteme erhalten Sie von Ihrem Greiner Bio-One Vertriebshändler vor Ort oder auf der Website von Greiner Bio-One:
www.gbo.com/bioscience/biochips_download

Kapitel 8.1.2 DNA-Extraktion

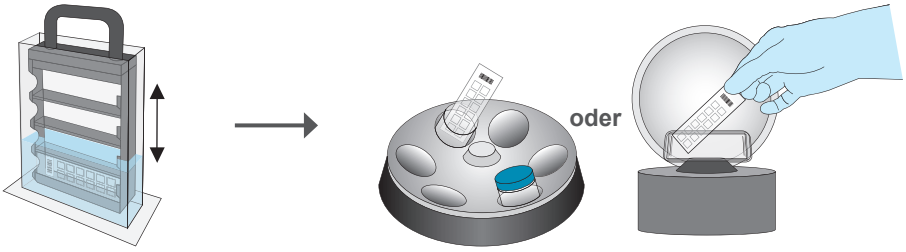
Kapitel 8.2 PCR



Kapitel 8.3.2 Hybridisierung



Kapitel 8.3.3 Waschen & Trocknen



Kapitel 8.4. Scannen & Auswertung

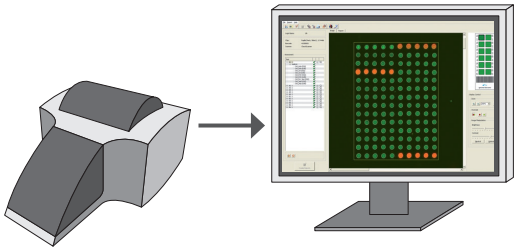


Abbildung 4: Übersicht über die verschiedenen Papill**oCheck®** **Arbeitsschritte**

8.1.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion ist nicht Teil des Papill**oCheck**® Testkits. Die Extraktion von DNA vor der Papill**oCheck**® Analyse muss mit dem oCheck® DNA-Extraktionskit durchgeführt werden, das ebenfalls von Greiner Bio-One erhältlich ist (Bestellinformationen finden Sie in Kapitel 2). Bitte halten Sie sich beim Gebrauch des oCheck® DNA-Extraktionskits genau an die Gebrauchsanweisung.

Für die DNA-Extraktion mit dem oCheck® DNA-Extraktionskit werden 250 µl Probenlösung benötigt.

Proben von humanen zervikalen Abstrichen, die mit dem
- Papill**oCheck**® Probenentnahmeset (Greiner Bio-One; Kat.-Nr. 465 070)
- in PreservCyt® Probenentnahmemedium (Hologic, Bedford, MA, USA)

entnommen bzw. aufgenommen werden, können direkt verarbeitet werden.

Proben von zervikalen Abstrichen, die in dem
- Surepath™ Probenentnahmemedium (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) aufgenommen werden, müssen vor Gebrauch gewaschen werden: Zentrifugieren Sie **250 µl** der Probe für **5 Minuten bei 11.000 g** und resuspendieren Sie das Pellet in **250 µl** destilliertem Wasser. Anschließend können diese **250 µl** mit dem oCheck® DNA-Extraktionskit aufgereinigt werden.

Proben von zervikalen Abstrichen, die in dem
- STM™ Probenentnahmemedium (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgenommen werden, müssen verdünnt werden: hierfür zu **100 µl** Probe **150 µl** destilliertes Wasser geben. Die **250 µl** verdünnte Probe können mit dem oCheck® DNA-Extraktionskit aufgereinigt werden.

Wenn die Probe eines zervikalen Abstrichs stark konzentriert und bereits aggregiert zu sein scheint, muss die Probe im Allgemeinen vor Beginn der DNA-Extraktion verdünnt und homogenisiert werden!

Proben von zervikalen Abstrichen, die stark verdünnt sind und keine sichtbaren Zellen aufweisen, sollten konzentriert werden, um zur DNA-Extraktion eine höhere Zellausbeute zu erzielen: Zentrifugieren Sie 1000 µl der Probe für 5 Minuten bei 11.000 g und resuspendieren Sie das Pellet in 250 µl destilliertem Wasser. Anschließend können die 250 µl mit dem oCheck® DNA-Extraktionskit aufgereinigt werden.

!

Dieser Konzentrationsschritt ist nur für zervikale Abstrichproben geeignet, die mit dem Papill**oCheck**® Probenentnahmeset, in PreservCyt® Probenentnahmemedium oder in Surepath™ Probenentnahmemedium entnommen/aufgenommen worden sind. Wurde das STM™ Probenentnahmemedium verwendet, ist eine Konzentration durch Zentrifugation nicht möglich.

8.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um ein sehr empfindliches Verfahren, mit dem sich äußerst kleine DNA-Mengen nachweisen lassen. Zur Vermeidung einer Kontamination der Reaktion müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden (siehe Kapitel 7). Die für die PCR erforderlichen Enzyme HotStarTaq® Polymerase und Uracil-N-Glycosylase sind im Papill**oCheck**® Testkit nicht enthalten und müssen separat erworben werden (siehe Kapitel 2).

! Das Papill**oCheck**® Testkit wurde mit der HotStarTaq® Polymerase von Qiagen und der Uracil-N-Glycosylase von Fermentas validiert (Bestellinformationen in Kapitel 2). Die Verwendung dieser Enzyme ist eine Voraussetzung dafür, die angegebenen Leistungsparameter zu erfüllen.

8.2.1 Einstellen des Thermocyclers

Das Papill**oCheck**® Testkit ist mit den folgenden Thermocyclern validiert worden:

- GeneAmp® PCR-System 9700 (Applied Biosystems)
- Veriti™ 96-Well-Thermocycler (Applied Biosystems)
- peqSTAR 96X Universal (PEQLAB Biotechnologies GmbH)

! Es muss unbedingt einer der vorstehend genannten Thermocycler verwendet werden, um die angegebenen Leistungsparameter zu erfüllen.

Das Thermocycler-Programm für die Papill**oCheck**® PCR ist in **Tabelle 2** dargestellt.

Tabelle 2: Thermocycler-Programm für die Papill**oCheck**® **PCR**

Zeit	Temp. °C	Anzahl der Zyklen
20 min	37 °C	1
15 min	95 °C	1
30 s 25 s 45 s	95 °C 55 °C 72 °C	40
30 s 45 s	95 °C 72 °C	15
Halten (Hold)	10 °C	

Zusätzlich müssen bei jedem Thermocycler die folgenden Reaktionsparameter eingestellt werden. Eine Beschreibung der Vorgehensweise zum Einstellen dieser Parameter finden Sie in der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Thermocyclers.

GeneAmp® PCR-System 9700 (Applied Biosystems)
Stellen Sie das Reaktionsvolumen auf 26 µl, die Geschwindigkeit der Temperaturerhöhung (ramp speed) auf „9600” und die Deckeltemperatur auf 103 °C ein.

Veriti™ 96-Well-Thermocycler (Applied Biosystems)
Verwenden Sie das Hilfsprogramm zur Methodenkonvertierung (Convert Method) des Veriti™ 96-Well-Thermocyclers, um das Papill**oCheck**® PCR-Programm einzugeben, und wählen Sie den „9600 Emulation Mode”. Stellen Sie das Reaktionsvolumen auf 26 µl und die Deckeltemperatur auf 103 °C ein.

peqSTAR 96X Universal (PEQLAB Biotechnologies GmbH)
Verwenden Sie das vorpgrogrammierte PapilloCheck(R) PCR Programm „PapilloCheck.js“ gemeinsam mit dem Thermocycler. Für gewöhnlich kann das Programm unter folgendem Pfad aufgerufen werden: local/Scripts/GreinerBioOne/PapilloCheck.js.

8.2.2 Behandlung mit Uracil-N-Glycosylase (UNG)[5]

Der Papill**oCheck**® PCR MasterMix enthält dUTP, das während der Papill**oCheck**® PCR in die Amplifikationsprodukte eingebaut wird und so den Abbau der PCR-Produkte durch UNG ermöglicht. UNG spaltet das PCR-Produkt an den Stellen, an denen ein Desoxyuridylat-Rest eingebaut worden ist. Gespaltene PCR-Produkte werden anschließend nicht mehr amplifiziert. Eine UNG-Behandlung kann daher zur Eliminierung einer Kontamination mit Amplifikaten aus vorherigen PCR-Reaktionen verwendet werden.[6]

- Verdünnen Sie die Uracil-N-Glycosylase **1:200** in PCR-Wasser. Verwenden Sie für jeden Papill**oCheck®** PCR-Reaktionsansatz eine frische UNG-Verdünnung (siehe Kapitel 8.2.3). Die verdünnte UNG darf nicht wiederverwendet werden.
- Mischen Sie die UNG-Verdünnung sorgfältig, indem Sie sie entweder 2 Sekunden vortexen und anschließend zentrifugieren oder mehrmals auf und ab pipettieren.

Die Ausgangskonzentration der Uracil-N-Glycosylase beträgt 1 U/µl. Die Konzentration nach Verdünnung beträgt demnach 0,005 U/µl.

> **!** Das Papill**oCheck**® Testkit wurde mit der Uracil-N-Glycosylase von Fermentas validiert (siehe Kapitel 2). Die Verwendung dieses Enzyms ist eine Voraussetzung dafür, die angegebenen Leistungsparameter zu erfüllen.

- Geben Sie **1 µl** dieser Verdünnung zu jeder Papill**oCheck**® PCR-Reaktion (siehe Kapitel 8.2.3, **Tabelle 3**).

Diese Menge ist ausreichend, um eine Kontamination der PCR zu eliminieren. Achten Sie darauf, keine höher konzentrierte UNG-Lösung zu verwenden, da sich dies negativ auf die PCR-Effizienz auswirken könnte und so die Empfindlichkeit des Papill**oCheck**® reduziert wird.

Das PCR-Reaktionsgemisch wird für die UNG-Behandlung 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die UNG in einem weiteren 15-minütigen Inkubationsschritt bei 95 °C inaktiviert. Diese beiden Schritte sind bei der Papill**oCheck**® PCR bereits berücksichtigt und entsprechen den ersten beiden Schritten des Thermocycler-Programms (siehe **Tabelle 2**). Bei dem zweiten Schritt (15 Minuten bei 95 °C) wird einerseits die Uracil-N-Glycosylase inaktiviert und andererseits die HotStarTaq® Polymerase aktiviert.

> **!** Das UNG-System der Papill**oCheck**® PCR eliminiert nur Kontaminationen mit PCR-Produkten aus vorherigen PCR-Reaktionen. Andere Kontaminationen, beispielsweise solche, die während der Probenvorbereitung, der DNA-Extraktion oder der Zugabe von PCR-Template stattfinden, lassen sich damit nicht eliminieren. Es müssen daher nach wie vor die in Kapitel 7 beschriebenen Anweisungen und besonderen Vorsichtsmaßnahmen zur Verhinderung von Kontaminationen befolgt werden.

[5] Der Kauf des Papill**oCheck**® beinhaltet eine eingeschränkte Lizenz im Rahmen der US-Patente 5.035.996, 5.683.896, 5.945.313, 6.287.823 und 6.518.026 und entsprechender ausländischer Patente.
[6] Longo, M.C., et al., Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, Gene, 93, 125-128, 1990.

8.2.3 Ansatz der PCR-Reaktion

Mit Ausnahme der HotStarTaq® Polymerase und der Uracil-N-Glycosylase enthält der Papill**oCheck**® PCR MasterMix bereits alle Komponenten, die für die Durchführung der PCR-Reaktion benötigt werden (PCR-Puffer, $MgCl_2$, dNTPs, Primer, PCR-Kontroll-Template).

> **!** Das Papill**oCheck**® Testkit wurde mit der HotStarTaq® Polymerase von Qiagen validiert (siehe Kapitel 2). Die Verwendung dieses Enzyms ist eine Voraussetzung dafür, die angegebenen Leistungsparameter zu erfüllen

Das Reaktionsgemisch wird optimalerweise in einer geschützten Umgebung angesetzt, z. B. einer PCR-Hood, um eine Kontamination der Reaktion zu vermeiden.

- Setzen Sie das Reaktionsgemisch (bestehend aus Papill**oCheck**® PCR MasterMix, HotStarTaq® Polymerase und Uracil-N-Glycosylase) für die erforderliche Anzahl an PCR-Reaktionen entsprechend den Angaben in **Tabelle 3** an.

Wenn mehrere Proben analysiert werden, sollte das Reaktionsgemisch in einem Ansatz (Batch) (in der für alle Analysen benötigten Menge) angesetzt werden. Zum Ausgleich von Volumenschwankungen beim Pipettieren empfiehlt es sich, die Anzahl der Reaktionen (n) für jeden Chip um 1 zu erhöhen (=n+1), d. h. es wird ein für 13 Amplifikationsreaktionen ausreichendes Volumen des Reaktionsgemisches angesetzt, wenn 12 Proben getestet werden sollen (siehe **Tabelle 3**). Verwenden Sie pro Chip jeweils eines der 5 MasterMix-Röhrchen des Kits.

> **!** Es wird empfohlen, bei jedem Papill**oCheck**® PCR MasterMix-Ansatz eine Negativkontrolle mitzuführen. Als Negativkontrolle eignet sich der DNA-Elutionspuffer des jeweiligen DNA-Extraktionskits oder PCR-Wasser.

- Mischen Sie das Reaktionsgemisch gründlich, indem Sie es entweder 2 Sekunden vortexen und anschließend zentrifugieren oder mehrmals auf und ab pipettieren.
- Aliquotieren Sie das Reaktionsgemisch, indem Sie pro PCR-Reaktion **21 µl** des Reaktionsgemisches in ein dünnwandiges 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettieren.

Die DNA-Template-Zugabe sollte in einem separaten Arbeitsbereich durchgeführt werden (siehe Kapitel 7.2).

- Geben Sie jeder PCR-Reaktion **5 µl** DNA-Extrakt zu und mischen Sie den Reaktionsansatz, indem Sie ihn entweder 2 Sekunden vortexen und anschließend zentrifugieren oder mehrmals auf und ab pipettieren. Das Gesamtvolumen einer PCR-Reaktion beträgt **26 µl**.
- Stellen Sie die Reaktionsgefäße in den Thermocycler und starten Sie die PCR-Reaktion mit dem in Kapitel 8.2.1 beschriebenen Thermocycler-Programm (**Tabelle 2**).

> **!** Nach Abschluss der PCR sollten die Amplifikationsprodukte entweder sofort für die Hybridisierung verwendet oder bis zu eine Woche im Dunkeln bei -20 °C aufbewahrt werden.

Tabelle 3: Ansetzen der Papill**oCheck®** **PCR-Reaktion**

	1 Reaktion	13 Reaktionen (1 Chip)	26 Reaktionen (2 Chips)	39 Reaktionen (3 Chips)	52 Reaktionen (4 Chips)
Papill**oCheck®** **PCR MasterMix**	19,8 µl	257,4 µl	514,8 µl	772,2 µl	1029,6 µl
HotStarTaq® Polymerase (5 E/µl)	0,2 µl	2,6 µl	5,2 µl	7,8 µl	10,4 µl
Uracil-N-Glycosylase (1:200 verdünnt, (0,005 E/µl)	1 µl	13 µl	26 µl	39 µl	52 µl
Gesamtvolumen vor Zugabe von Proben-DNA	21 µl	273 µl	546 µl	819 µl	1092 µl
DNA-Extrakt aus zervikaler Probe (DNA-Template)	5 µl				
Gesamtvolumen pro Reaktion	26 µl				

8.3 Hybridisierung und Waschen

8.3.1 Vorbereitung

Die Hybridisierung muss bei Raumtemperatur (20-25 °C) durchgeführt werden. Beginnen Sie mit den erforderlichen Vorbereitungen für die Hybridisierung und die Waschschritte spätestens 30 Minuten vor Beginn der Hybridisierung.

- Lassen Sie die Hybridisierungs- und Waschpuffer 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) stehen, damit sich etwaige Niederschläge lösen können, und mischen Sie sie vor Gebrauch gründlich.

Die Aufbewahrung des Papill**oCheck**® Testkit bei 4-8 °C kann dazu führen, dass das SDS im Hybridisierungspuffer und in Puffer B ausfällt. Lassen Sie die Lösungen Raumtemperatur annehmen und vortexen bzw. schütteln Sie anschließend das Gefäß bzw. die Flasche, bis sich der Niederschlag vollständig gelöst hat.

- Bereiten Sie die oCheck® Hybridisierungskammer vor: Legen Sie ein frisches feuchtes Papiertuch in die Hybridisierungskammer und schließen Sie den Deckel, damit eine mit Feuchtigkeit gesättigte Atmosphäre entsteht.

Die Hybridisierung muss in einer mit Feuchtigkeit gesättigten Atmosphäre stattfinden, um eine Verdunstung des geringen Volumens auf dem Chip zu vermeiden. Von Greiner Bio-One ist eine spezielle Hybridisierungskammer für die Papill**oCheck**® Analyse erhältlich (siehe Kapitel 2).

- Inkubieren Sie die erforderliche Anzahl an Papill**oCheck**® Chips mindestens 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (20-25 °C) in der vorbereiteten Hybridisierungskammer.

> **!** Der magnetische Objektträgerhalter der Hybridisierungskammer enthält nur auf einer Seite einen Magneten. Wenn weniger als vier Papill**oCheck**® Chips parallel hybridisiert werden sollen, müssen Sie darauf achten, den Objektträgerhalter von der dem Magneten gegenüber liegenden Seite aus mit Papill**oCheck**® Chips zu bestücken. Andernfalls sind die Papill**oCheck**® Chips während der Waschschritte nicht mit Flüssigkeit bedeckt.

- Setzen Sie die Waschlösungen I, II und III nach der folgenden Anleitung an.

Ansetzen der Waschlösungen I, II und III:

- Bereiten Sie so viel Waschlösung für die Waschlösungen I, II und III vor, wie Sie für die zu analysierende Anzahl an Papill**oCheck**® Chips benötigen (siehe **Tabelle 4**).
- Aliquotieren Sie drei gleiche Volumina der Waschlösung in drei separate oCheck® Waschbehälter und beschriften Sie diese als Waschlösung I, II und III. Jeder oCheck® Waschbehälter ist mit einer eingravierten Skala versehen, welche die korrekte Menge an Waschlösung für bis zu 4 Chips anzeigt. Bitte verwenden Sie diese Skala zur Überprüfung des Waschlösungsvolumens.
- Wärmen Sie Waschlösung II vor dem Gebrauch mindestens 20 Minuten bei 50 °C in einem temperaturgeregelten Wasserbad vor. Achten Sie darauf, dass der Füllstand des Wasserbads dem Füllstand der Waschlösung II entspricht.

Tabelle 4: Herstellung der Waschlösung
Die in dieser Tabelle angegebenen Volumen sind ausreichend für alle drei Waschschritte (Waschlösung I, II und III) und für die angegebene Anzahl an Papill**oCheck**® Chips.

	Anzahl an Papill**oCheck**® Chips			
Komponenten	**1**	**2**	**3**	**4**
Destilliertes oder entionisiertes Wasser	140 ml	280 ml	420 ml	560 ml
Papill**oCheck**® **Puffer A - Konzentrat**	14 ml	28 ml	42 ml	56 ml
Papill**oCheck**® **Puffer B- Konzentrat**	1,75 ml	3,5 ml	5,25 ml	7 ml
Gesamtvolumen	155,75 ml	311,50 ml	467,25 ml	623 ml

!

Die Waschlösungen dürfen auf keinen Fall wiederverwendet werden, da dies zu einer Ansammlung abgewaschener PCR-Produkte und dadurch zu einer Verfälschung der Papill**oCheck**® Ergebnisse führen könnte. Verwenden Sie für jeden Test frische Waschlösungen.

Die vorbereitete Waschlösung kann bis zu eine Woche lang bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Überprüfen Sie, ob SDS ausgefallen ist. Ist dies der Fall, erwärmen Sie die Waschlösung, bis sich der Niederschlag gelöst hat, und lassen Sie das Gemisch anschließend wieder Raumtemperatur annehmen. Führen Sie dann die Vorbereitungen für das nächste Hybridisierungsexperiment durch.

8.3.2 Hybridisierung

Die Hybridisierung muss bei Raumtemperatur (20-25 °C) durchgeführt werden. Die wichtigsten Arbeitsschritte zum Hybridisieren der PCR-Produkte der Papill**oCheck**® PCR-Reaktion auf dem Papill**oCheck**® Chip sind in **Abbildung 5** gezeigt.

- Mischen und zentrifugieren Sie die PCR-Produkte kurz vor der Verwendung.

Wurden die PCR-Produkte bis zur Hybridisierung bei -20 °C aufbewahrt, müssen Sie sie vor dem Mischen zunächst auftauen, bevor Sie wie beschrieben fortfahren können.

- Vortexen Sie den Hybridisierungspuffer vor der Verwendung und zentrifugieren Sie ihn kurz.
- Mischen Sie **30 µl** des Papill**oCheck**® Hybridisierungspuffers in einem frischen Reaktionsgefäß eines PCR 8er-Streifens mit **5 µl** PCR-Produkt, indem Sie entweder kurz vortexen oder den Ansatz mehrmals auf und ab pipettieren.
- Zentrifugieren Sie den Ansatz kurz.
- Überführen Sie in jedes Chip-Well **25 µl** des Hybridisierungsgemisches und verwenden Sie dazu 6 Kanäle einer Multikanalpipette. Achten Sie darauf, dass keine Luftbläschen entstehen!

Es empfiehlt sich, jeweils 6 Proben parallel mit einer 8-Kanal-Multipipette zu pipettieren (siehe **Abbildung 5**). Dadurch erhöhen sich Effizienz und Geschwindigkeit des Arbeitsschrittes und das Verdunstungsrisiko wird reduziert. Werden mehrere Objektträger gleichzeitig pipettiert, ist der Gebrauch einer Multikanalpipette obligatorisch, um die korrekte Hybridisierungsdauer einzuhalten.

Es sollten möglichst alle 12 Wells eines Chips hybridisiert werden. Falls weniger als 12 Proben analysiert werden sollen, lassen Sie die unbenutzten Wells leer. Unbenutzte Wells auf einem gebrauchten Chip können nicht für künftige Proben verwendet werden.

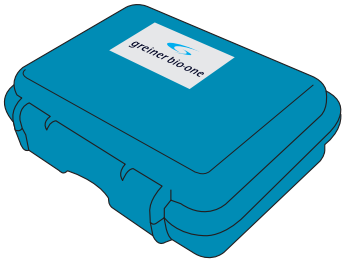
! Behandeln Sie den Chip umsichtig, um ein Verschütten des Hybridisierungsgemisches zu vermeiden. Verschütten kann zu Kreuzkontamination der Proben und zu falschpositiven Ergebnissen führen.

Inkubieren Sie den Chip in der mit Feuchtigkeit gesättigten Atmosphäre der vorbereiteten Hybridisierungskammer exakt 15 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) im Dunkeln. Achten Sie darauf, die Hybridisierungskammer während der Hybridisierung nicht zu bewegen.

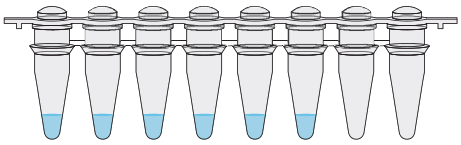
! Ändern Sie keinesfalls Inkubationsdauer oder Temperatur der Hybridisierungsreaktion, da dies entweder zu einem Verlust der Intensität des Fluoreszenzsignals oder zu einem Anstieg unspezifischer Fluoreszenzsignale führen könnte.

Setzen Sie die hybridisierten Chips nicht direkt dem Sonnenlicht aus.

- Bereiten Sie in der Hybridisierungskammer eine mit Feuchtigkeit gesättigte Atmosphäre vor.
- Inkubieren Sie die erforderliche Anzahl an Papill**oCheck**® Chips bei Raumtemperatur (20-25 °C) in der Hybridisierungskammer (siehe Kapitel 8.3.1).



- Mischen Sie 30 µl Papill**oCheck**® Hybridisierungspuffer in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß eines PCR-Streifens mit 5 µl PCR-Produkt. Gründlich mischen.



- Überführen Sie mit einer Multikanalpipette in jedes Well des Papill**oCheck**® Chips **25 µl** des Hybridisierungsgemisches.

- Schließen Sie die Hybridisierungskammer und inkubieren Sie den Papill**oCheck**® Chip exakt **15 Minuten** bei Raumtemperatur (20-25 °C).

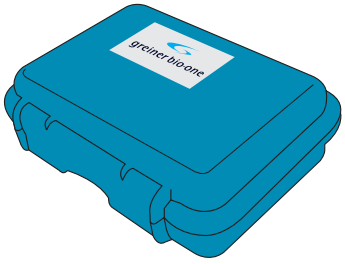


Abbildung 5: Arbeitsschritte bei der Hybridisierung

8.3.3 Waschen und Trocknen

Mit dem von Greiner Bio-One erhältlichen Spezial-Equipment können bis zu vier Papill**oCheck**® Chips gleichzeitig gewaschen werden (siehe Kapitel 2). Das für die Verarbeitung der Papill**oCheck**® Chips benötigte zusätzliche Equipment besteht aus drei oCheck® Waschbehältern und einem Griff für den magnetischen Objektträgerhalter der Hybridisierungskammer.

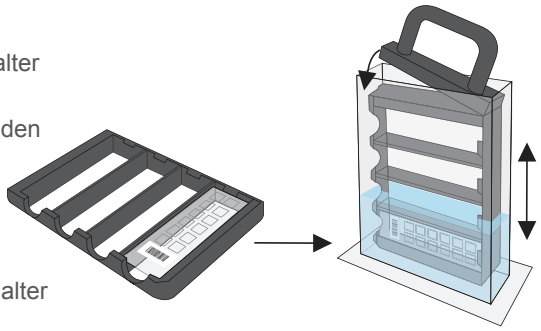
Die verschiedenen Arbeitsschritte sind in **Abbildung 6** dargestellt.

- Heben Sie den magnetischen Objektträgerhalter mit den hybridisierten Papill**oCheck**® Chips vorsichtig aus der Hybridisierungskammer.
- Tauchen Sie den Objektträgerhalter mit den Papill**oCheck**® Chips direkt in den oCheck® Waschbehälter mit Waschlösung I. Achten Sie darauf, dass die Magnetseite nach oben zeigt.
- Bringen Sie den oCheck® Griff an dem Objektträgerhalter an und beginnen Sie mit dem ersten von insgesamt drei Waschschritten.
- Waschen Sie den Chip bei **Raumtemperatur (20-25 °C)** in **Waschlösung I**, indem Sie ihn **10 Sekunden** lang rasch auf und ab bewegen. Die Arrays müssen dabei stets mit Waschlösung bedeckt bleiben.
- Waschen Sie den Chip für **60 Sekunden** in der auf **50 °C** vorgewärmten **Waschlösung II**, indem Sie ihn kräftig auf und ab bewegen.
- Waschen Sie den Chip bei **Raumtemperatur (20-25 °C)** in **Waschlösung III**, indem Sie ihn **10 Sekunden** lang rasch auf und ab bewegen.
- Entfernen Sie durch Zentrifugation **sofort** sämtliche Flüssigkeit von der Chip-Oberfläche. Wenn Sie für die Mikroarrays eine spezielle Tischzentrifuge verwenden, beträgt die Zentrifugationsdauer **1 Minute**. Wenn Sie eine für 50 ml Gefäße geeignete Zentrifuge verwenden, geben Sie je einen gewaschenen Papill**oCheck**® Chip in ein 50 ml Gefäß und zentrifugieren Sie **3 Minuten bei 500 g** bei **Raumtemperatur**.

Der Papill**oCheck**® Chip ist nun bereit zum Scannen und sollte unverzüglich gescannt werden. Spülen Sie die oCheck® Waschbehälter nach jedem abgeschlossenen Wasch- und Trocknungsprozess zum Reinigen mehrmals mit Wasser aus.

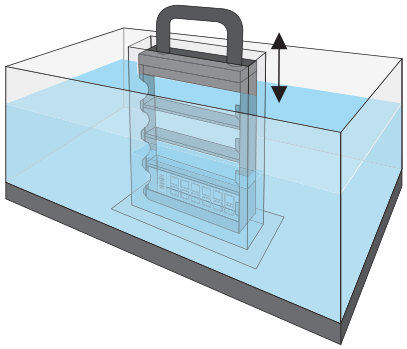
Erster Waschschritt

- Heben Sie den magnetischen Objektträgerhalter vorsichtig aus der Hybridisierungskammer.
- Tauchen Sie den Objektträgerhalter rasch in den oCheck® Waschbehälter mit Waschlösung I
- Bringen Sie den oCheck® Griff an
- Waschen Sie den/die Papill**oCheck®** Chip(s) bei **Raumtemperatur 10 Sekunden** lang in Waschlösung I, indem Sie den Objektträgerhalter auf und ab bewegen



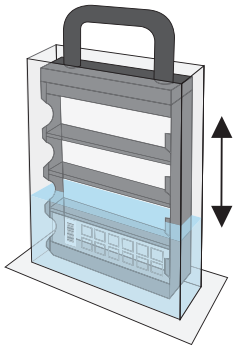
Zweiter Waschschritt

- Waschen Sie den/die Papill**oCheck®** Chip(s) in der in einem Wasserbad vorgewärmten Waschlösung bei **50 °C** für **60 Sekunden**, indem Sie den Objektträgerhalter auf und ab bewegen



Dritter Waschschritt

- Waschen Sie den/die Papill**oCheck®** Chip(s) bei **Raumtemperatur 10 Sekunden** lang in Waschlösung III, indem Sie den Objektträgerhalter auf und ab bewegen



Trocknen

- Entfernen Sie durch Zentrifugieren sofort sämtliche Flüssigkeit von der Oberfläche der Papill**oCheck®** Chips

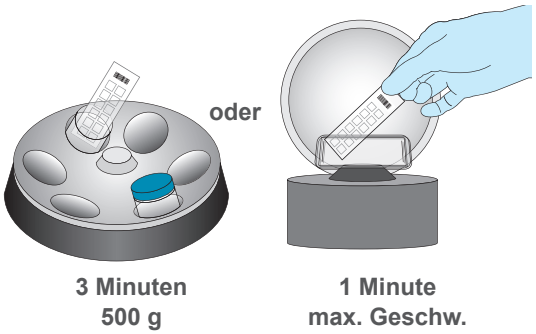


Abbildung 6: Arbeitsschritte beim Waschen
Die verschiedenen Wasch- und Trocknungsschritte vor der Analyse des Papill**oCheck®** Chips mit dem CheckScanner™ und der CheckReport™ Software.

8.4 Scannen und Auswertung des Papill**oCheck®** Chips

Legen Sie den/die Papill**oCheck®** Chip(s) in den CheckScanner™ und fahren Sie mit dem Scannen fort, wie es ausführlich im Benutzerhandbuch der CheckReport™ Software beschrieben ist.

Ausführlichere Informationen zur Installation des CheckScanner™ und der CheckReport™ Software sowie zu den Anforderungen an das Computersystem finden Sie in der entsprechenden Gebrauchsanweisung des CheckScanner™ und der CheckReport™ Software.

Bei jeder Datenanalyse mit der CheckReport™ Software muss sichergestellt werden, dass die auf Ihrem Computer installierte Version der CheckReport™ Software mit der auf dem aktuell verwendeten Papill**oCheck®** Kit angegebenen Version übereinstimmt. Ist dies nicht der Fall, muss die CheckReport™ Software aktualisiert werden. Die neueste Software-Version kann von der Greiner Bio-One Website heruntergeladen werden:
www.gbo.com/bioscience/biochips_download

9. FEHLERBEHEBUNG

Gehen Sie vor, wie im Folgenden beschrieben, wenn während des Scannens des Chips eine oder mehrere der folgenden Fehlermeldungen angezeigt wird/werden oder wenn die Papill**oCheck**® Analyse aufgrund bestimmter Kontrollen auf dem Chip fehlschlägt. Wenn Sie Fragen zu oder Probleme mit Papill**oCheck**® Produkten haben, wenden Sie sich bitte an Ihren Greiner Bio-One Vertriebshändler vor Ort.

PROBLEM und Ursache	Anmerkungen und Vorschläge
FEHLERMELDUNG „COULD NOT READ BARCODE“ (BARCODE KONNTE NICHT GELESEN WERDEN)	
Beschädigter Barcode	Überprüfen Sie den Barcode auf Beschädigungen. Geben Sie den Barcode manuell ein, wenn das entsprechende Fenster geöffnet wird.
Falsch geladener Chip	Überprüfen Sie die Ausrichtung des Chips und scannen Sie den Chip in der korrekten Ausrichtung.
FEHLERMELDUNG „MISSING SPOTS“ (FEHLENDE SPOTS), DRUCKONTROLLE FEHLGESCHLAGEN ODER ORIENTIERUNGSKONTROLLE FEHLGESCHLAGEN	
Staub auf dem Chip	Wiederholen Sie die Hybridisierung des/der PCR-Produkt(e) auf einem anderen Chip.
Bildung von Luftbläschen während des Überführens des Hybridisierungsgemisches auf den Chip	Wiederholen Sie die Hybridisierung des/der PCR-Produkt(e) auf einem anderen Chip. Gehen Sie beim Pipettieren vorsichtig vor, damit keine Luftbläschen entstehen.
HYBRIDISIERUNGSKONTROLLE FEHLGESCHLAGEN	
Falsche Temperierung der Waschlösung II	Der zweite Waschschritt muss bei 50 °C durchgeführt werden. Vergewissern Sie sich, dass die Waschlösung II 50 °C warm ist.
Falsche Temperierung des Wasserbads	Der zweite Waschschritt muss bei 50 °C durchgeführt werden. Überprüfen Sie die Temperatur des Wasserbads. Vergewissern Sie sich, dass das Wasserbad auf eine Temperatur von 50 °C eingestellt ist. Überprüfen Sie notfalls die Temperatur mit einem Thermometer.
Falsches Ansetzen des Hybridisierungsgemisches	Setzen Sie das Hybridisierungsgemisch noch einmal mit den korrekten Volumina an und hybridisieren Sie die PCR-Produkte auf einem anderen Chip.

PROBLEM und Ursache	Anmerkungen und Vorschläge
PCR-KONTROLLE FEHLGE-SCHLAGEN	
Keine Zugabe von HotStarTaq® DNA-Polymerase zum MasterMix	Wiederholen Sie die Papill**oCheck®**-Analyse ab dem Schritt der Vorbereitung der PCR-Reaktion.
Zugabe defekter HotStarTaq® DNA-Polymerase zum MasterMix	Wiederholen Sie die Papill**oCheck®**-Analyse ab dem Schritt der Vorbereitung der PCR-Reaktion.
Zugabe unverdünnter Uracil-N-Glycosylase zum MasterMix	Wiederholen Sie die Papill**oCheck®**-Analyse ab dem Schritt der Vorbereitung der PCR-Reaktion.
Unzureichendes Mischen des Reaktionsgemisches	Wiederholen Sie die Papill**oCheck®**-Analyse ab dem Schritt der Vorbereitung der PCR-Reaktion. Achten Sie darauf, das Reaktionsgemisch gründlich zu mischen.
Vorhandensein von PCR-Inhibitoren in der Probe	Wiederholen Sie die DNA-Extraktion und die Papill**oCheck®**-Analyse.
Durchführung der Hybridisierung ohne Zugabe von PCR-Produkt	Wiederholen Sie die Hybridisierung.
Unzureichendes Mischen des Hybridisierungsgemisches	Wiederholen Sie die Hybridisierung.
Probleme mit dem Thermocycler	Überprüfen Sie die Funktion und die korrekte Programmierung des Thermocyclers (PCR-Schritte, Geschwindigkeit der Temperaturerhöhung, Volumen). Achtung: Verwenden Sie entweder das GeneAmp® PCR-System 9700 (Applied Biosystems) als Thermocycler oder den Veriti™ 96-Well-Thermocycler (Applied Biosystems) in Kombination mit Papill**oCheck®**.
PROBENKONTROLLE FEHLGESCHLAGEN	
Keine Zugabe von Proben-DNA zu der PCR-Reaktion	Wiederholen Sie die Papill**oCheck®**-Analyse ab dem Schritt der Vorbereitung der PCR-Reaktion.
DNA-Aufreinigung fehlgeschlagen	Wiederholen Sie die DNA-Extraktion.
Nicht genügend Probenmaterial vorhanden	Die Probenentnahme ist fehlgeschlagen. Die Probe ist äußerst transparent. Konzentrieren Sie die Probe entsprechend der Beschreibung in Kapitel 9.1 und wiederholen Sie die DNA-Extraktion oder wiederholen Sie die Probenentnahme.
PCR- UND/ODER PROBENKONTROLLE IST NICHT FEHLGESCHLAGEN, ES WIRD ABER EIN SNR-WERT VON 0 ANGEZEIGT	Dieses Ergebnis wird als gültig eingestuft, wenn die CheckReport™ Software mindestens einen HPV-Typ in der Probe mit einem Signal über einem definierten Schwellenwert erfasst. Die Proben- und/oder PCR-Kontrolle kann in diesem Fall aufgrund einer Kompetition während der PCR ein nur schwaches oder gar kein Fluoreszenzsignal liefern.

10. TECHNISCHER SUPPORT

Im Kundendienst von Greiner Bio-One stehen Ihnen erfahrene Wissenschaftler mit umfassendem theoretischem und praktischem Fachwissen auf dem Gebiet der Molekularbiologie und der oCheck® Produkte zur Verfügung. Wenn Sie Fragen zu oder Probleme mit oCheck® Produkten haben, wenden Sie sich bitte an Ihren Greiner Bio-One Vertriebshändler vor Ort.

11. LEISTUNGSMERKMALE VON PAPILLOCHECK®

11.1 Analytische Leistungsbewertung von PapillOCheck®

11.1.1 Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde mithilfe von Referenzplasmiden, welche die von Papill**oCheck**® verwendetet E1-Zielregion enthielten, für jeden nachweisbaren HPV-Typ ermittelt. Die Nachweisgrenzen sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

Tabelle 5: Nachweisgrenzen der nachweisbaren HPV-Typen

HPV-Genotyp	Kopien/ Reaktion	pg/ml**
HPV 6	30*	0,052
HPV 11	150*	0,26
HPV 16	50*	0,086
HPV 18	300*	0,516
HPV 31	300*	0,522
HPV 33	300*	0,519
HPV 35	750*	1,29
HPV 39	30*	0,052
HPV 40	30*	0,052
HPV 42	30*	0,052
HPV 43	100*	0,175
HPV 44	30*	0,052
HPV 45	50*	0,087
HPV 51	30*	0,051
HPV 52	100*	0,174
HPV 53	30*	0,052
HPV 56	30*	0,052
HPV 58	150*	0,255
HPV 59	50*	0,087
HPV 66	100*	0,171
HPV 68	30*	0,052
HPV 70	30*	0,052
HPV 73	200*	0,338
HPV 82	30*	0,052

* Jede Konzentration eines HPV-Referenzplasmids wurde in 2 unabhängigen Verdünnungsreihen angesetzt und in 3 Replikaten gemessen (d. h. insgesamt 6 Replikate pro Konzentration). Darüber hinaus enthielt jeder Test 10 ng menschliche DNA. Im Falle einer Variation der validierten Daten wurden die Konzentrationen des betreffenden Plasmids erhöht oder verringert und erneut getestet (6 Replikate aus 2 unabhängigen Verdünnungsreihen). Die Nachweisgrenze war die niedrigste Konzentration, bei der alle 6 Replikate positiv waren.

** Direkt analysiert, ohne Berücksichtigung der DNA-Aufreinigung. Die Mengenangabe bezieht sich auf die in dem Plasmid vorhandene HPV-DNA.

11.1.2 Analytische Spezifität – HPV-Typen

Die Referenzplasmide für die aufgeführten HPV-Typen wurden mit 2,12 x 10^6 Kopien/PCR-Reaktion getestet.

HPV 6b, HPV 11, HPV 13, HPV 16, HPV 18, HPV 26, HPV 30, HPV 31, HPV 33, HPV 34, HPV 35, HPV 39, HPV 40, HPV 42, HPV 43, HPV 44, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 53, HPV 54, HPV 55, HPV 56, HPV 58, HPV 59, HPV 61, HPV 66, HPV 67, HPV 68, HPV 69, HPV 70, HPV 71, HPV 73, HPV 74, HPV 81, HPV 82, HPV 84, HPV 85, HPV 91.

Es wurden folgende Kreuzhybridisierungen festgestellt:
HPV 55 liefert ein Signal mit der HPV 44-Sonde. Die CheckReport™ Software zeigt deshalb ein HPV 44/HPV 55-Kombinationsergebnis an.

HPV 13 kann mit der HPV 11-Sonde kreuzreagieren, liefert aber kein falschpositives Signal, da HPV 13 in zervikalen Proben nicht vorkommt.

11.1.3 Analytische Spezifität – Nicht-HPV-Organismen

Es wurden folgende Nicht-HPV-Organismen mit Papill**oCheck**® getestet (5-10 ng genomische DNA). Es wurden keine positiven Signale erhalten.

Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter lwoffii, Actinobacillus actinomycetemcomitans Serovar c, Actinomyces odontolyticus, Actinomyces viscosus, Bacillus subtilis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium breve, Campylobacter concisus, Campylobacter gracilis, Campylobacter rectus, Candida albicans, Capnocytophaga gingivalis, Capnocytophaga ochracea, Capnocytophaga sputigena, Citrobacter amalonaticus, Citrobacter freundii, Citrobacter freundii, Citrobacter koseri, Citrobacter koseri, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Eikenella corrodens, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterobacter sakazakii, Enterococcus durans, Enterococcus faecali, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Eubacterium nodatum , Fusobacterium nucleatum, Gardnerella vaginalis, Hafnia alvei, Kingella denitrificans, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Lactobacillus casei, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus iners, Lactobacillus rhamnosus,Lactobacillus vaginalis, Mogibacterium timidum, Morganella morganii, Mycoplama hominis, Mycoplasma buccale, Mycoplasma faucium, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma orale, Mycoplasma pirum, Mycoplasma salivrium, Mycoplosma pneumoniae, Neisseria elongata, Neisseria gonorrhoeae, Peptoniphilus asaccharolyticus, Peptostreptococcus anaerobius, Peptostreptococcus micros, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Proteus hauseri, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus ssp. aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus saprophyticus, Stenotrophomonas maltophilia, Streptococcus agalactiae, Streptococcus constellatus, Streptococcus criceti, Streptococcus cristatus, Streptococcus gordonii, Streptococcus intermedius, Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus oralis, Streptococcus parasanguinis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguinis, Streptococcus sobrinus, Tannerella forsythensis (vormals: Bacteroides forsythus), Treponema denticola, Ureaplasma uralyticum, Veillonella parvula.

11.2 Wiederholpräzision

Zur Überprüfung der Wiederholpräzision des Tests wurden fünf Proben, die jeweils drei verschiedene HPV-Referenz-Templates sowie DNA aus dem menschlichen Genom enthielten, mit Papill**oCheck**® analysiert. Die Kopienzahl der verschiedenen, in den Proben vorhandenen HPV-Zielregionen sowie die Menge der menschlichen DNA im Hintergrund wurden variiert (siehe **Tabelle 6**). Jede Probe wurde in fünf unabhängigen Replikaten mit Papill**oCheck**® analysiert. Die Replikate wurden an drei Tagen jeweils vom selben Laboranten getestet.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Proben zur Überprüfung der Wiederholpräzision

Proben-ID	HPV-Typ	Menge an DNA-Template	x-Faches der Nachweisgrenze
Probe 1	HPV 16 HPV 18 HPV 31 menschliche genomische DNA	180 Kopien 1.500 Kopien 1.400 Kopien 1 ng	3 10 30
Probe 2	HPV 16 HPV 18 HPV 31 menschliche genomische DNA	180 Kopien 1.500 Kopien 1.400 Kopien 5 ng	3 10 30
Probe 3	HPV 16 HPV 18 HPV 45 menschliche genomische DNA	1.800 Kopien 450 Kopien 300 Kopien 5 ng	30 3 10
Probe 4	HPV 16 HPV 18 HPV 45 menschliche genomische DNA	10.000 Kopien 5.000 Kopien 20.000 Kopien 2,5 ng	- - - -
Probe 5	HPV 18 HPV 31 HPV 45 menschliche genomische DNA	4.500 Kopien 500 Kopien 90 Kopien 2,5 ng	30 10 3

In allen fünf Proben und bei jeder Analysewiederholung wurden die drei richtigen HPV-Typen erkannt, und die Analyse war für den nicht enthaltenen Typ negativ. Demnach waren 75 von 75 Einzeltestergebnissen (5 Proben x 5 Replikate x 4 verschiedene HPV-Templates) korrekt.

11.3 Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision des Papill**oCheck**® Testkits wurde mithilfe von 22 klinischen Proben (siehe **Tabelle 7**) ermittelt, die HPV in Konzentrationen an der Nachweisgrenze enthielten. Die Bestimmung wurde mit derselben Methode, mit identischem Probenmaterial von unterschiedlichen Personen und in unterschiedlichen Laboren mit unterschiedlichem Equipment durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als konkordant für positive Proben klassifiziert, wenn bei Einzel- oder Zweifachinfektionen identische HPV-Typen erkannt wurden oder wenn bei Mehrfachinfektionen mit drei oder vier Typen zwei bzw. drei identische HPV-Typen erkannt wurden.

Tabelle 7: Ergebnisse der Überprüfung der Vergleichspräzision

Proben-Nr.	Ergebnis Labor 1	Ergebnis Labor 2	Konkordanz
1	HPV 33	HPV 33	+
2	HPV 35	HPV 35	+
3	negativ	negativ	+
4	HPV 45	HPV 45	+
5	HPV 51, HPV 52	HPV 51, HPV 52	+
6	HPV 51, HPV 56	HPV 51, HPV 56	+
7	HPV 16, HPV 39, HPV 68	HPV 16, HPV 39, HPV 68, HPV 82	+
8	HPV 39, HPV 68	HPV 39, HPV 68	+
9	HPV 16	HPV 16	+
10	negativ	negativ	+
11	HPV 56, HPV 44/55	HPV 56, HPV 44/55	+
12	negativ	negativ	+
13	HPV 11, HPV 18, HPV 56	HPV 11, HPV 18, HPV 56	+
14	HPV 51, HPV 44/55	HPV 51, HPV 44/55	+
15	HPV 53, HPV 58, HPV 43	HPV 53, HPV 58, HPV 68, HPV 43	+
16	negativ	negativ	+
17	HPV 16	HPV 16	+
18	HPV 16	HPV 16	+
19	HPV 45	HPV 45	+
20	HPV 16	HPV 16	+
21	HPV 53, HPV 58	HPV 53, HPV 58	+
22	HPV31	HPV 31	+

Es wurden mit allen klinischen Proben konkordante Ergebnisse erhalten. Die in Labor 2 erfassten Signale zusätzlicher Typen in den mehrfach infizierten Proben 7 (HPV 82) und 15 (HPV 68) lagen nur knapp über dem definierten Schwellenwert, und diskordante Ergebnisse wurden als unproblematisch klassifiziert.

11.4 Robustheit

Zur Untersuchung der Robustheit des Papill**oCheck**® Testsystems wurden Variationen der folgenden Parameter geprüft:

- Hybridisierungstemperatur
- Hybridisierungsdauer
- Waschtemperatur
- Waschdauer

Alle Tests wurden in 3 Replikaten mit hohen Template-Konzentrationen (1 ng HPV-Referenzplasmid oder ca. 200 x 10^6 Kopien je Probe) durchgeführt. Die untersuchten Wertebereiche der Parameter, in denen ein robuster Nachweis von HPV mit Papill**oCheck**® möglich ist, sind in **Tabelle 8** aufgeführt.

Tabelle 8:Robustheit von Papill**oCheck**®

Parameter	Bereich
Hybridisierungstemperatur	20-25 °C
Hybridisierungsdauer	13-17 Minuten
Waschtemperatur	48-52 °C
Waschdauer	1. Waschschritt 10-15 Sekunden
	2. Waschschritt 60-75 Sekunden
	3. Waschschritt 10-15 Sekunden

11.5 Klinische Leistungsbewertung von Papill**oCheck®**

Zur klinischen Leistungsbewertung des Papill**oCheck®** Tests mittels der Bestimmung der klinischen Sensitivität und Spezifität wurde eine Vergleichsstudie mit Papill**oCheck®** und dem GP5+/6+-PCR EIA-Test durchgeführt.[7] In dieser Studie wurden Proben von 1.437 repräsentativen Frauen mit normaler Zytologie (Kontrollgruppe) im Alter über 40 Jahren (Durchschnittsalter 49 Jahre; Altersbereich 40 bis 60 Jahre) und von 192 repräsentativen Frauen (Durchschnittsalter 34 Jahre; Altersbereich 30 bis 60 Jahre) mit histologisch bestätigten CIN3+-Läsionen (Fallgruppe) analysiert. Alle in dieser Studie verwendeten Proben stammten ursprünglich von Frauen in der Interventionsgruppe der populationsbasierten, randomisierten, kontrollierten Implementierungsstudie POBASCAM und wurden zu Beginn der Studie entnommen (baseline round).[8]

Nach Beschränkung der Papill**oCheck®** Analyse auf die 14 hrHPV-Typen, die mit dem GP5+/6+-PCR-EIA erfasst werden, zeigte Papill**oCheck®** eine klinische Sensitivität für ≥ CIN3 von 95,8 % (184/192; 95 % KI 92,8-98,8) und eine klinische Spezifität für ≥ CIN2 von 96,7 % (95 % KI 95,7-97,7). Für den GP5+6+-PCR-EIA lagen die Werte vergleichsweise bei 96,4 % (185/192; 95 % KI: 93,9-98,9) bzw. 97,7 % (95 % KI: 96,9-98,5) (siehe **Tabelle 9 und 10**).

Tabelle 9: Vergleich der nach Kontrollen und Fällen stratifizierten Ergebnisse des PapilloCheck®** (14 hr HPV-Typen) und des GP5+/6+ PCR-EIA.**

	Papill**oCheck®** (14 hr HPV-Typen)	GP5+/6+-PCR/EIA		Gesamt
		-	+	-
Kontrollen	- + Gesamt	1.386 (96,5 %) 18 (1,3 %) 1.404 (97,7 %)	4 (0,3 %) 29 (2,0 %) 36 (2,3 %)	1.390 (96,7 %) 47 (3,3 %) 1,437
Fälle	- + Gesamt	4 (2,1 %) 3 (1,6 %) 7 (3,6 %)	4 (2,1 %) 181 (94,3 %) 185 (96,4 %)	8 (4,2 %) 184 (95,8 %) 192

Tabelle 10: Klinische Sensitivität und Spezifität des PapilloCheck®** und des GP5+/6+-PCR-EIA (Ergebnisse für mindestens einen der 14 hr HPV-Typen HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 oder 68).**

14 hrHPV	Papill**oCheck®**	GP5+/6+
Klinische Sensitivität für ≥ CIN3	95,8 %	96,4 %
Klinische Spezifität für ≥ CIN2	96,7 %	97,7 %

[7] Comparison of the clinical performance of Papill**oCheck®** human papillomavirus detection with that of the GP5+/6+-PCR-enzyme immunoassay in population-based cervical screening. Hesselink AT, Heideman DA, Berkhof J, Topal F, Pol RP, Meijer CJ, Snijders PJ. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):797-801. Epub 2009 Dec 30.

[8] Bulkmans, N. W., L. Rozendaal, P. J. Snijders, F. J. Voorhorst, A. J. Boeke, G. R. Zandwijken, F. J. van Kemenade, R. H. Verheijen, K. Groningen, M. E. Boon, H. J. Keuning, M. van Ballegooijen, A. J. van den Brule, and C. J. Meijer. 2004. POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. Int. J. Cancer 110:94–101.

Zur Untersuchung der Prävalenz der vom Papill**oCheck**® erfassten HPV-Typen wurden zervikale Abstriche von 881 Frauen gescreent.[9] Alle zervikalen Proben wurden in STM™ Probenentnahmemedium (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgenommen. Am häufigsten war HPV 16 mit einer Nachweisrate von 19,4 %, gefolgt von HPV 31, HPV 39, HPV 51 und HPV 52. In **Tabelle 11** sind die Prävalenzen für alle nachweisbaren Typen aufgeführt.

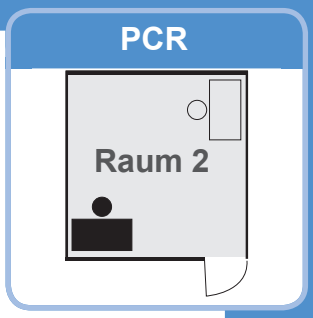
Tabelle 11: Prävalenz der mit Papill**oCheck**® **nachweisbaren HPV-Typen**

HPV-Genotyp	Prävalenz mit dem Papill**oCheck**®
HPV 16	19,40 %
HPV 31	14,40 %
HPV 39	9,30 %
HPV 51	9,10 %
HPV 52	7,50 %
HPV 56	7,40 %
HPV 58	6,10 %
HPV 53	6,10 %
HPV 42	5,80 %
HPV 66	5,90 %
HPV 68	5,60 %
HPV 45	4,50 %
HPV 33	4,40 %
HPV 18	4,00 %
HPV 70	4,10 %
HPV 44/55	3,10 %
HPV 59	2,50 %
HPV 82	1,90 %
HPV 35	1,60 %
HPV 73	1,50 %
HPV 43	0,80 %
HPV 6	0,60 %
HPV 11	0,60 %
HPV 40	0,40 %

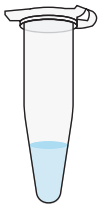
[9] Evaluation of the performance of the novel Papill**oCheck**® HPV genotyping test by comparison with two other genotyping systems and the HC2 test. Schopp B, Holz B, Zago M, Stubenrauch F, Petry KU, Kjaer SK, Iftner T. J Med Virol. 2010 Apr;82(4):605-15.

12. PAPILLOCHECK® KURZPROTOKOLL

12.1 Raum 2: PCR - Ansatz des Reaktionsgemisches

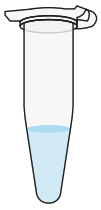


- Uracil-N-Glycosylase **1:200** in PCR-Wasser verdünnen
- UNG-Verdünnung sorgfältig mischen



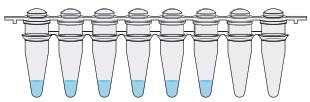
- Das Reaktionsgemisch für die erforderliche Anzahl an PCR-Reaktionen ansetzen

	1 Reaktion	13 Reaktionen (1 Chip)	26 Reaktionen (2 Chips)	39 Reaktionen (3 Chips)	52 Reaktionen (4 Chips)
Papill**oCheck®** **PCR MasterMix**	19,8 µl	257,4 µl	514,8 µl	772,2 µl	1029,6 µl
HotStarTaq® Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	2,6 µl	5,2 µl	7,8 µl	10,4 µl
Uracil-N-Glycosylase (1:200 verdünnt, 0,005 U/µl)	1 µl	13µl	26 µl	39 µl	52 µl
Gesamtvolumen vor Zugabe von Proben-DNA	21 µl	273 µl	546 µl	819 µl	1092 µl



- Das Reaktionsgemisch sorgfältig mischen

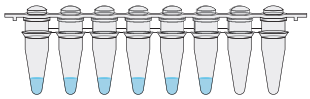
- Das Reaktionsgemisch aliquotieren: Für jede PCR-Reaktion **21 µl** des Reaktionsgemisches in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß eines PCR-Streifens geben



KURZPROTOKOLL

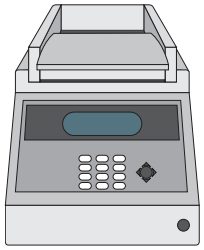
12.2 Raum 2: PCR - Zugabe von DNA-Template/ PCR-Reaktion

- In jede PCR-Reaktion **5 µl** DNA-Template zugeben
- Gründlich mischen



- Die PCR-Reaktion mit dem vorbereiteten Thermocycler-Programm starten

Zeit	Temp. °C	Anzahl der Zyklen
20 min	37 °C	1
15 min	95 °C	1
30 s 25 s 45 s	95 °C 55 °C 72 °C	40
30 s 45 s	95 °C 72 °C	15
Halten (Hold)	10 °C	

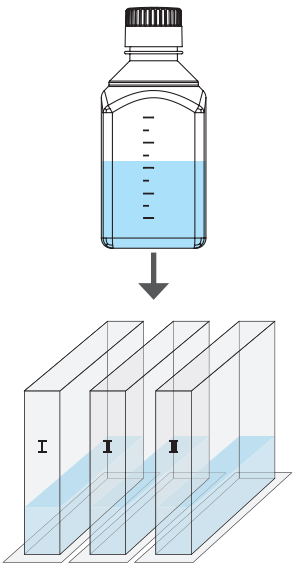


12.3 Raum 3: Hybridisierung - Vorbereitung/ Hybridisierungsreaktion

! Beginnen Sie mit den Vorbereitungen spätestens 30 Minuten vor Beginn der Hybridisierung.

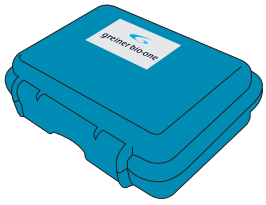
- Etwaige Niederschläge in Hybridisierungs- und Waschpuffern auflösen und gut mischen
- Genügend Waschlösung für die Anzahl der zu analysierenden Papill**oCheck**® Chips ansetzen.

	Anzahl an Papill**oCheck**® Chips			
Komponenten	**1**	**2**	**3**	**4**
Destilliertes oder entionisiertes Wasser	140 ml	280 ml	420 ml	560 ml
Papill**oCheck**® **Puffer A Konz.**	14 ml	28 ml	42 ml	56 ml
Papill**oCheck**® **Puffer B Konz.**	1,75 ml	3.5 ml	5.25 ml	7 ml
Gesamtvolumen	155,75 ml	311,50 ml	467,25 ml	623 ml

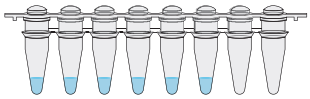


- Die Waschlösung in drei oCheck® Waschbehälter aliquotieren
- Waschlösung II in einem Wasserbad auf **50 °C** aufwärmen

- Die zu analysierende Anzahl an Papill**oCheck**® Chips bei Raumtemperatur in der vorbereiteten Hybridisierungskammer inkubieren

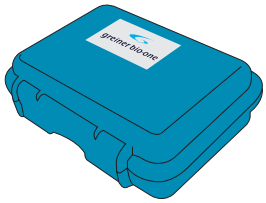


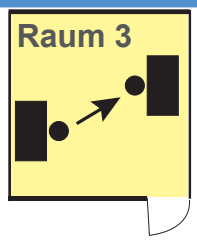
- Die PCR-Produkte mischen und kurz zentrifugieren
- Hybridisierungspuffer mischen und kurz zentrifugieren
- **30 µl** Papill**oCheck**® Hybridisierungspuffer mit **5 µl** PCR-Produkt mischen
- Gründlich mischen und kurz zentrifugieren



- Mit einer Multikanalpipette in jedes Well des Papill**oCheck**® Chips **25 µl** des Hybridisierungsgemisches überführen
- Bildung von Luftbläschen vermeiden

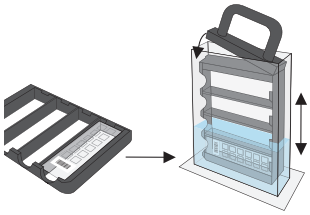
- Den Papill**oCheck**® Chip exakt **15 Minuten** bei **Raumtemperatur (20-25 °C)** inkubieren



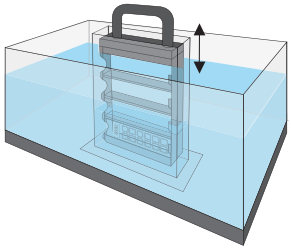


12.4 Raum 3: Waschen & Trocknen/ Scannen & Auswertung

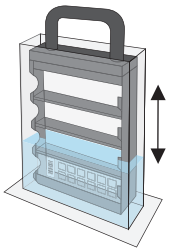
- Den magnetischen Objektträgerhalter aus der Hybridisierungskammer heben
- Den Objektträgerhalter in den oCheck® Waschbehälter mit Waschlösung I tauchen
- Den oCheck® Griff anbringen
- Den/die Papill**oCheck**® Chip(s) bei **Raumtemperatur 10 Sekunden** in Waschlösung I waschen



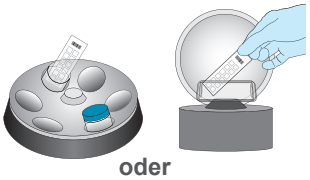
- Den/die Papill**oCheck**® Chip(s) **60 Sekunden** in der auf **50 °C** vorgewärmten Waschlösung II waschen



- Den/die Papill**oCheck**® Chip(s) bei **Raumtemperatur 10 Sekunden** in Waschlösung III waschen



- Durch Zentrifugieren sämtliche Flüssigkeit von der Oberfläche des Papill**oCheck**® Chips entfernen



3 Minuten 500 g **oder** **1 Minute max. Geschw.**

- Den/die Papill**oCheck**® Chip(s) mit dem CheckScanner™ scannen
- Scannen und Auswertung nach Beschreibung im Benutzerhandbuch der CheckReport™ Software
- Berichte erstellen